

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LAÍS SEVILHA DOS SANTOS

**QUANTIFICAÇÃO DO kDNA DE *Leishmania Viannia* POR qPCR EM  
DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LESÕES CUTÂNEAS DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

BRASÍLIA  
2018

**QUANTIFICAÇÃO DO kDNA DE *Leishmania Viannia* POR qPCR EM  
DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LESÕES CUTÂNEAS DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

LAÍS SEVILHA DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas, na área de concentração: Ciências Aplicadas em Saúde.

Orientador: Prof. MD. PhD. Ciro Martins Gomes.

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

BRASÍLIA  
2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SSE511q Sevilha-Santos , Laís  
Quantificação do kDNA de Leishmania Viannia por qPCR em diferentes profundidades de lesões cutâneas de Leishmaniose Tegumentar Americana / Laís Sevilha-Santos ; orientador Ciro Martins Gomes; co-orientador Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. -- Brasília, 2018.  
101 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Leishmaniose Tegumentar Americana . 2. qPCR. 3. Diagnóstico. 4. Camadas da pele . 5. Leishmania Viannia . I. Gomes, Ciro Martins, orient. II. Sampaio, Raimunda Nonata Ribeiro , co-orient. III. Título.

**QUANTIFICAÇÃO DO kDNA DE *Leishmania Viannia* POR qPCR EM  
DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LESÕES CUTÂNEAS DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**BANCA EXAMINADORA**

**Presidente**

Professor Dr. Ciro Martins Gomes

Universidade de Brasília - UnB

**Membros**

Professor Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves

Universidade de Brasília - UnB

Professor Dr. Otávio de Toledo Nobrega

Universidade de Brasília - UnB

**Suplente**

Professor Dr. Kleyton de Carvalho Mesquita

Tribunal Regional do Trabalho 10ª Região - TRT

29 de junho de 2018

## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por essa vida extraordinária e por todos os momentos em que a fé foi meu único conforto.

Agradeço à Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio que mesmo sem me conhecer bem, apresentou-me ao Dr. Ciro Martins Gomes. Os dois juntos me ensinaram que o trabalho em equipe é a forma mais compensatória de realizar uma pesquisa científica.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ciro Martins Gomes pela ideia do projeto e por toda a paciência no modo de ensinar. Sua dedicação à pesquisa e aos pacientes é inspiradora, e todos os seus ensinamentos foram muito importantes para a minha formação.

À Viviane Medeiros Silva, que me acompanhou durante toda a execução do trabalho, e não poupou esforços para que eu aprendesse todas as técnicas necessárias para o desenvolvimento da pesquisa. Tornamo-nos amigas ao longo desses dois anos, e espero que saiba o quanto sou grata por tudo.

À Jaqueline Osiro Bergmann, amiga valiosa que aceitou o desafio de ser pesquisadora, e contribuiu ativamente para a conclusão do trabalho. A perícia na sua forma de trabalho foi inspiradora.

À professora Beatriz Dolabela de Lima e Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior, por cederem tempo, conhecimento e os equipamentos para a realização do trabalho.

Aos residentes, staffs e enfermeiros do setor de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília – HUB, por dedicarem tempo para que as coletas fossem realizadas da melhor forma possível. Em especial às residentes Dra. Karen Fernandes de Oliveira, Dra. Natália Souza Medeiros e Dra. Larissa Freire Segato, e às enfermeiras Rita de Cassia Pereira Esmeralda e Nayara Daris dos Santos.

Aos pacientes que aceitaram ser incluídos na pesquisa.

Ao aluno de PIBIC Arthur Youssif Mota Arabi, pelo auxílio com as fichas clínicas.

Ao estatístico Eduardo Freitas da Silva, pela contribuição com a parte estatística.

À Natália Aparecida de Paula, pela contribuição para finalizar o trabalho.

Ao técnico do laboratório, Tércio Rodrigues Pereira, pelo auxílio com a parte de parasitologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa fornecida para que eu conseguisse me dedicar exclusivamente ao projeto.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários da coordenação e secretaria do programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UnB, que estão sempre dispostos a responder perguntas e solucionar problemas.

À minha mãe, Maria de Fátima Sevilha da Silva, por não poupar esforços para que eu tivesse tudo que fosse necessário ao longo dos últimos 2 anos. Espero ser capaz de retribuir um dia toda a sua dedicação.

Ao meu namorado, Marcos Vinícius Nery, por não me deixar desistir nos momentos mais apreensivos. Seu incentivo para que eu me tornasse uma pessoa melhor foi fundamental ao longo dessa caminhada.

À minha família que está presente em todos os momentos da minha vida, o incentivo foi fundamental para o meu crescimento.

*Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.*

*Sócrates.*



## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Esquema terapêutico para Leishmaniose cutânea localizada.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Reagentes e condições utilizadas para a PCR da região ITS1.

**Tabela 2.** Ciclos utilizados para a amplificação da região ITS1.

**Tabela 3.** Reagentes e condições utilizadas para a amplificação do primer PPr e PPf.

**Tabela 4.** Ciclos utilizados para a amplificação do *primer* PPr e PPf.

**Tabela 5.** Características demográficas dos grupos controle e LTA.

**Tabela 6.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de IFI dentro dos grupos.

**Tabela 7.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de cultura dentro dos grupos.

**Tabela 8.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de esfregaço dentro dos grupos.

**Tabela 9.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia quanto a pesquisa de amastigota no histopatológico dentro dos grupos.

**Tabela 10.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia quanto a compatibilidade histopatológica dentro dos grupos.

**Tabela 11.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de PCR convencional dentro dos grupos.

**Tabela 12.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de qPCR dentro dos grupos.

**Tabela 13.** Resultados da quantificação, sensibilidade, especificidade e acurácia em cada uma das camadas de pele.

**Tabela 14.** Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes classificatórios e da qPCR.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Título de artigo publicado por Eduardo Rabello no Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia, em 1925.

**Figura 2.** Ciclo de vida de *Leishmania* spp..

**Figura 3.** Casos de LTA descritos ao longo do território brasileiro em 2015.

**Figura 4.** Lesão de LC em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.

**Figura 5.** Lesão de LC localizada em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.

**Figura 6.** Lesão de LC disseminada em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.

**Figura 7.** Lesão de LC difusa.

**Figura 8.** Gráfico demonstrando uma curva de *L. braziliensis* (vermelha) e *L. amazonensis* (laranja), demonstrando o Cq e as fases *ground phase*, exponencial, linear e platô.

**Figura 9.** Aspirado da borda da lesão em caso atendido no ambulatório de Dermatologia.

**Figura 10.** Tubos de cultura de NNN modificado.

**Figura 11.** Local escolhido para retirada do fragmento de pele em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.

**Figura 12.** Lâminas de pesquisa de amastigotas coradas com *Giemsa*.

**Figura 13.** Separação da epiderme, derme superior, derme inferior e hipoderme.

**Figura 14.** Curvas de amplificação realizadas com controles positivos: verde escuro = cultura de *Leishmania (L.) amazonensis* (Cq média = 16.33), preto = *Leishmania (L.) chagasi* (Cq média = 16.44) e roxo = *Leishmania (V.) braziliensis* (Cq média = 9.28), e controle negativo de pele sadia em verde fluorescente.

**Figura 15.** Demonstração de curvas do DNA de pele saudável (rosa: Cq 34.15) e branco (verde: Cq 35.45).

**Figura 16.** (A) Curvas de amplificação e (B) curvas *melting*, das cepas de referência utilizadas como controles positivos.

**Figura 17.** Curva padrão construída com *L. braziliensis*, demonstrando a média dos Cq da diluição seriada.

**Figura 18.** Curva de amplificação para confirmar extração das amostras negativas. Controle positivo em rosa (pele saudável: média Cq = 24.39) e branco em preto (média Cq = 37.36).

**Figura 19.** Curva *melting* dos controles de pele saudável e branco. Controle positivo em rosa (pele saudável: média  $T_m = 91.95^\circ\text{C}$ ) e branco em preto (média  $T_m = 63.98^\circ\text{C}$ ).

**Figura 20.** Fluxo dos pacientes dentro do estudo.

**Figura 21.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), da epiderme e derme superior do paciente 17, que demonstrou positividade nas 4 camadas de pele.

**Figura 22.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), da derme inferior e hipoderme do paciente 17, que demonstrou positividade nas 4 camadas de pele.

**Figura 23.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), da epiderme e derme superior do paciente 23, que demonstrou negatividade nas 4 camadas de pele.

**Figura 24.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), derme inferior e hipoderme do paciente 23, que demonstrou negatividade nas 4 camadas de pele.

**Figura 25.** Ilustração do comportamento da sensibilidade e especificidade. Cálculo da área sob uma curva levando em consideração apenas os valores de  $C_q$ .

**Figura 26.** Curva de amplificação do controle positivo em rosa (pele saudável), branco em preto e paciente 3 alocado para o grupo controle, em azul.

**Figura 27.** Curva *melting* de controle positivo em rosa (pele saudável), branco em preto e paciente 3 alocado para o grupo controle, em azul.

**Figura 28.** Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela HaeIII em amostras de pele. MP: Marcador 100pb; (1) Paciente 21; (2) Paciente 20; (3) Paciente 19; (4) Paciente 13; (5) Paciente 12; (6) Paciente 11; (7) Paciente 5; (8) Paciente 4; (9) Cultura de *L. braziliensis*; (10) Cultura de *L. chagasi*; (11) Cultura de *L. amazonensis*; (12) Água ultrapura; (13) Controle negativo de sangue.

**Figura 29.** Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela HaeIII em amostras de pele. (MP) Marcador 100pb; (1) Paciente 44; (2) Paciente 43; (3) Paciente 38; (4) Paciente 37; (5) Paciente 33.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC	<i>Area under the curve</i> (área sob a curva)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cq	<i>Quantification cycle</i>
DF	Distrito Federal
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ECG	Eletrocardiograma
fg	Fentograma
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Faculdade de Medicina
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IC	Intervalo de Confiança
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
kDNA	DNA do cinetoplasto
LACEN	Laboratório do Centro de Saúde Pública do Distrito Federal
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
M	Massa molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
MP	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NNN	<i>Neal Novy Nicolle</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
QR	Intervalo Quartil
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica de Operação do Receptor)
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico ribossômico)
Sb+5	Antimônio pentavalente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tm	<i>Temperature melting</i>
UnB	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
1.1 Histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	20
1.2 Parasito	21
1.3 Epidemiologia	23
1.4 Clínica da leishmaniose	24
1.4.1 Leishmaniose cutânea (LC)	25
1.4.2 Leishmaniose mucosa (LM)	27
1.5 Diagnóstico	27
1.6 Tratamento	28
1.7 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	32
2.1 Justificativa	32
<b>3. HIPÓTESE DO ESTUDO</b>	33
<b>4. OBJETIVOS</b>	34
4.1 Objetivo geral	34
4.2 Objetivos específicos	34
<b>5. METODOLOGIA</b>	35
5.1 Local e período do estudo	35
5.2 Cálculo amostral	35
5.3 População estudada	35
5.4 Critérios para alocação no grupo com LTA	35
5.5 Critérios para alocação no grupo controle	36
5.6 Critérios de exclusão	36
5.7 Exames realizados	36
5.8 Exames e procedimentos realizados para a classificação dos pacientes	37
5.8.1 Imunofluorescência indireta (IFI)	37
5.8.2 Cultura do aspirado da lesão	37
5.8.3 Fragmento de pele para exame de esfregaço, histopatológico, PCR convencional (classificatório) e PCR em tempo real (qPCR) (teste índice)	38
5.8.4 Histopatológico	39
5.8.5 Esfregaço	39
5.8.6 Técnica de <i>salt-split skin</i>	40
5.8.7 Extração do DNA	40
5.8.8 Quantificação do DNA	40
5.8.9 PCR convencional	41
5.9 Teste avaliado (teste índice)	42
5.9.1 PCR em tempo real (qPCR)	42
5.9.2 Critérios de positividade	43
5.10 Reação em cadeia da polimerase / Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR - RFLP)	45
5.11 qPCR para queratina humana	45
5.12 Análise estatística	46
5.13 Comitê de ética em pesquisa	47
5.14 Análise de prontuário	47
<b>6. RESULTADOS</b>	48
6.1 Características clínicas e populacionais	48
6.1.1 Grupo controle	49
6.1.2 Grupo LTA	50
6.2 Exames classificatórios	50

6.2.1 Imunofluorescência indireta (IFI).....	50
6.2.2 Cultura do aspirado da lesão .....	51
6.2.3 Esfregaço.....	51
6.2.4 Histopatológico .....	52
6.2.5 PCR convencional .....	53
6.3 Exame testado.....	53
6.3.1 qPCR qualitativa (teste índice).....	53
6.4 Quantificação das camadas da pele .....	56
6.5 Comparação dos resultados (testes classificatórios x qPCR) .....	59
6.6 qPCR de queratina humana.....	59
6.7 PCR-RFLP.....	60
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	62
7.1 Considerações sobre a inclusão dos pacientes .....	62
7.2 Grupo controle (resultado falso positivo).....	62
7.3 Padronização da qPCR.....	63
7.4 Exames classificatórios.....	64
7.5 Teste índice (qPCR) .....	64
7.6 Eliminação transepidérmica .....	65
7.7 Quantificação das camadas da pele .....	65
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	67
8.1 Conclusão inicial.....	67
8.2 Quantificação de protozoários na porção epidérmica, dérmica superior, dérmica inferior e no subcutâneo das bordas de úlceras cutâneas .....	67
8.3 Teste da acurácia diagnóstica da qPCR nas diferentes camadas da pele .....	67
8.4 Discussão sobre a técnica de biópsia mais adequada (profundidade necessária) para o diagnóstico da LTA .....	68
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69
<b>ANEXO 1</b> .....	74
<b>ANEXO 2</b> .....	77
<b>ANEXO 3</b> .....	81
<b>ANEXO 4</b> .....	85
<b>ANEXO 5</b> .....	93
<b>ANEXO 6</b> .....	94
<b>APÊNDICE 1</b> .....	95
<b>APÊNDICE 2</b> .....	96
<b>APÊNDICE 3</b> .....	97
<b>APÊNDICE 4</b> .....	99
<b>APÊNDICE 5</b> .....	101

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um grande problema de saúde pública, e no Brasil ocorreu por todo o território nacional. Na época atual, ainda representa um grande desafio para o clínico, pela complexidade das formas de manifestação da doença. Os exames parasitológicos (esfregaço e cultura) e histopatológico apresentam uma boa especificidade diagnóstica, mas uma sensibilidade insatisfatória, em relação ao exame de imunofluorescência indireta (IFI) é caracterizado pela alta sensibilidade, mas uma baixa especificidade diagnóstica. A toxicidade dos tratamentos disponíveis fundamenta a busca frequente por técnicas mais precisas e menos invasivas no reconhecimento da LTA. Nesse estudo, utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para quantificar o cinetoplasto do DNA (kDNA) de *Leishmania* spp. em lesões de LTA nas diferentes camadas da pele. O estudo recrutou pacientes com suspeita clínica de LTA, no Hospital Universitário de Brasília – HUB. Exames de IFI, esfregaço, cultura do aspirado da lesão, histopatológico e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional foram utilizados para alocar os pacientes em dois grupos: LTA e controle. A separação da epiderme da derme superior foi feita pela técnica de *salt split skin*, e as demais camadas foram separadas por bisturi estéril. A qPCR foi realizada de forma qualitativa e quantitativa utilizando os *primers* PPf-5'- GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3' e PPr-5'-GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3', resultando em um amplificado de 120pb, para encontrar e quantificar o kDNA de *Leishmania* spp.. Foram incluídos 59 pacientes na pesquisa, sendo que 40 foram designados para o grupo LTA e 19 para o grupo controle. Dentre todos os exames utilizados para a alocação dos grupos, o histopatológico em relação à compatibilidade apresentou a maior acurácia diagnóstica (82,35% IC 95% = 69,75 - 90,43). A epiderme ( $159,1 \times 10^6$ ) e a derme superior ( $75,4 \times 10^6$ ) respectivamente, mostraram um maior número de parasitos do que na derme inferior ( $54,6 \times 10^6$ ) e hipoderme ( $16,8 \times 10^6$ ), porém, essa diferença não foi significativa ( $p > 0.05$ ). A acurácia obtida na derme superior (77,9% IC 95% = 65,9 - 86,7), foi significativamente maior que a acurácia das amostras da epiderme e hipoderme ( $p = 0,039$  em ambas as comparações). No grupo LTA, a maior sensibilidade alcançada foi nas amostras da derme superior (67,5% IC 95% = 50,9 - 81,43), e no grupo controle, a epiderme, derme superior e hipoderme alcançaram



100% (IC 95% 82,3 - 100 / 82,5 - 100 / 81,5 - 100) de especificidade. Futuros estudos sobre a eliminação transepidérmica como mecanismo de defesa do parasito, devem levar em consideração o kDNA de *Leishmania* spp. encontrado na epiderme no presente estudo. Concluiu-se que técnicas de coletas mais superficiais e menos invasivas são suficientes para encontrar um grande número de parasitos de *Leishmania* spp..

**Palavras-chave:** Leishmaniose; qPCR; kDNA; Quantificação; *Leishmania* spp.; Saúde pública; LTA.

## ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a major public health problem, and in Brazil occurred throughout the national territory. At the present time, it still represents a great challenge for the clinician, due to the complexity form of the manifestation of the disease. Parasitological (smear and culture) and histopathological exams have good diagnostic specificity, but an unsatisfactory sensitivity, in relation to indirect immunofluorescence (IFI) is characterized by high sensitivity, but low diagnostic specificity. The toxicity of the available treatments fundamental the frequent search for more accurate and less invasive techniques in the recognition of ATL. In this study, was used the real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) to quantify the DNA kinetoplast (kDNA) of *Leishmania* spp. in ATL lesions on different layers of the skin. The study recruited patients with clinical suspicion of ATL at the University Hospital of Brasília - HUB. IFI exams, smear, culture of the aspirate of the lesion, histopathological and conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) were used to allocate the patients in two groups: ATL and control. The separation of the epidermis from the upper dermis was done by the salt split skin technique, and the other layers were separated by sterile scalpel. The qPCR was performed of form qualitative and quantitative using primers PPr-5'-GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3' and PPr-5'-GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3', resulting in an amplification of 120pb, to find and quantify the kDNA of *Leishmania* spp.. Were included 59 patients in the study, of whom 40 were assigned to the ATL group and 19 were assigned to the control group. Among all the tests used for the allocation of the groups, the histopathological aspects in relation to compatibility showed the highest diagnostic accuracy (82.35% CI 95% = 69.75 - 90.43). The epidermis (159.1 x 10<sup>6</sup>) and the upper dermis (75.4 x 10<sup>6</sup>), respectively, showed a higher number of parasites than in the lower dermis (54.6 x 10<sup>6</sup>) and hypodermis (16.8 x 10<sup>6</sup>) however, this difference was not significant (p > 0.05). Accuracy achieved in the upper dermis (77.9% CI 95% = 65.9-86.7) was significantly higher than the accuracy of the epidermis and hypodermis samples (p = 0.039 in both comparisons). In the ATL group, the highest sensitivity was found in the samples of the upper dermis (67.5% CI 95% = 50.9 - 81.43), and in the control group, the epidermis, upper dermis and hypodermis reached 100% (82.3 - 100 / 82.5 - 100 / 81.5 - 100) of specificity. Future studies on transepidermal elimination as a defense mechanism of the parasite should

take into consideration the kDNA of *Leishmania* spp. found in the epidermis in the present study. Was concluded that more superficial and less invasive collection techniques are sufficient to find large numbers of parasites of *Leishmania* spp ..

**Keywords:** Leishmaniasis; qPCR; kDNA; Quantification; *Leishmania* spp.; Public health; ATL.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é considerada um grave problema da saúde pública. Caracterizada como uma antroponose e considerada uma das seis doenças infecto parasitárias de maior importância mundial, principalmente pela sua grande capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2017).

No Brasil, possivelmente foi descrita pela primeira vez no trabalho apresentado pelo médico dermatologista Juliano Moreira com o título: "Existe na Bahia o botão de Biskra?: estudo clínico", na sessão do dia 30 de dezembro de 1894 da Sociedade de Medicina e Cirurgia da Bahia, que em 1895 foi publicada na *Gazeta Medica da Bahia* (Moreira, 1895a, p.254-258). Neste trabalho, Moreira se baseou nos numerosos casos clínicos e apresentou uma descrição detalhada das formas clínicas, afirmando pela primeira vez no Brasil a existência do botão de Biskra, relacionando com o botão ou úlcera do Oriente ou botão endêmico dos países quentes. Essa foi provavelmente a primeira descrição de casos clínicos no Brasil sobre a LTA cutânea (JACOBINA; GELMAN, 2008).

Em 1909, ocorreu a confirmação da presença de formas de *Leishmania* em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas por Lindenberg, que encontrou os parasitos em trabalhadores de áreas em desmatamento de regiões que estavam em construção de rodovias no interior de São Paulo. Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa de LTA e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania braziliensis*. O papel do flebotomíneo na transmissão da doença só foi descrito posteriormente em 1922 por Aragão. Em 1925, Eduardo Rabello publicou um estudo que descrevia a sinonímia da doença (Figura 1). Roedores silvestres parasitados foram encontrados em áreas florestais de São Paulo, por Forattini no ano de 1958 (VALE; FURTADO, 2005; BRASIL, 2017).

Apesar de todos os estudos realizados sobre a Leishmaniose ao longo dos anos, uma série de questões ainda não foram totalmente esclarecidas e tornaram-se preocupações relevantes nos dias atuais.

## MEMORIAS ORIGINAES

**Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil****I — Historico e synonymia**por **Ed. Rabello**Professor de Clinica Dermatologica  
na Faculdade de Medicina do Rio

**Figura 1.** Título de artigo publicado por Eduardo Rabello no Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia, em 1925.

**Fonte:** Vale; Furtado, 2005.

## 1.2 Parasito

Protozoários do gênero *Leishmania* são os responsáveis por causar a doença, que se manifesta na pele e na mucosa do homem infectado pela forma promastigota do parasito. O flebotomíneo fêmea é responsável por transmitir a LTA para o hospedeiro definitivo através da picada (RANGEL; LAINSON, 2003; PITA-PEREIRA et al., 2009).

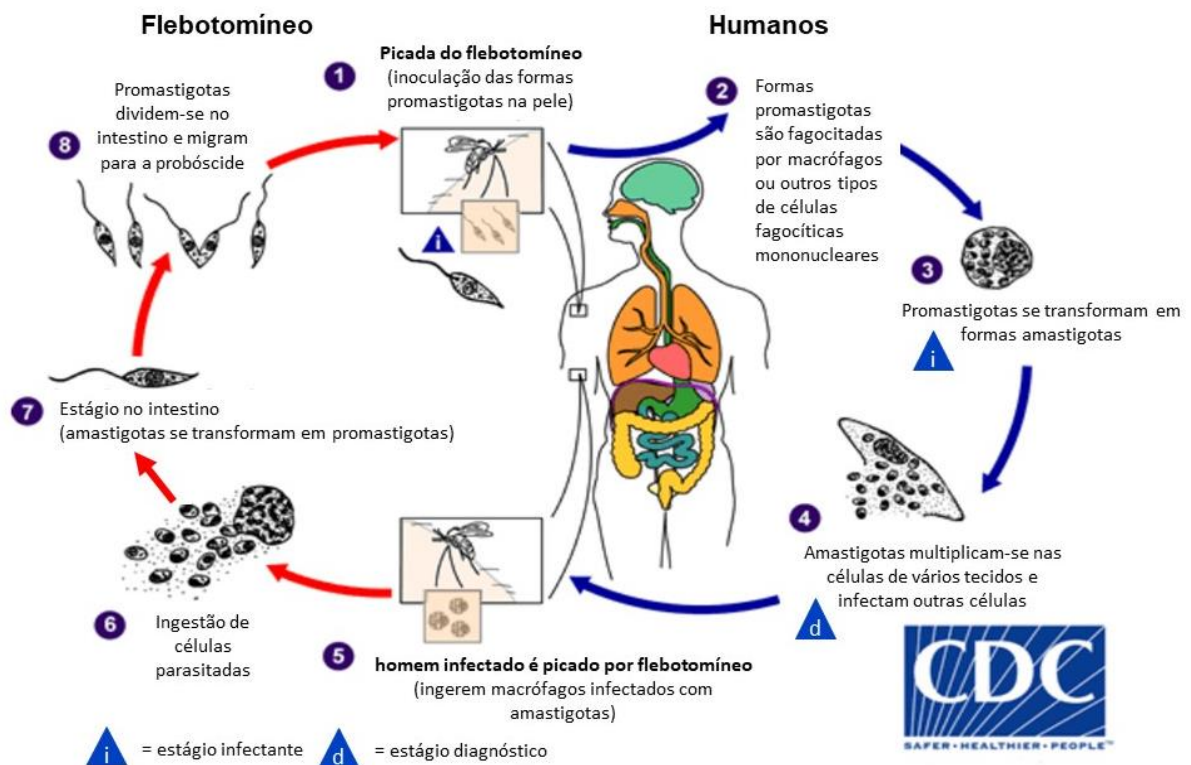
O protozoário pertence a filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Tripanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. É um parasito que pode ser encontrado em duas formas, uma no tubo digestivo do inseto vetor (promastigotas), e outra observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (amastigotas) (CAVALIER-SMITH, 2016).

Atualmente são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras de doença humana e 8 descritas apenas em animais. No Brasil, já foram descritas 6 espécies do subgênero *Viannia* e 1 do *Leishmania*. As três principais espécies identificadas causando infecção atualmente são: *Leishmania Viannia braziliensis*, *Leishmania Viannia guyanensis* e *Leishmania Leishmania amazonensis* (CERUTTI et al., 2017; BRASIL, 2017).

Os vetores responsáveis pela transmissão da doença pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (GALATI, 2003).

O ciclo de vida do parasito é digenético (heteroxênico), ou seja, o parasito vive alternadamente nos hospedeiros vertebrados e nos insetos vetores (Figura 2). Nos hospedeiros vertebrados, os parasitos assumem a forma amastigota (sem flagelo) que

se multiplica, exclusivamente dentro das células do sistema fagocítico mononuclear, rompendo os macrófagos e liberando formas amastigotas que serão fagocitadas novamente por outros macrófagos. Nos invertebrados, os parasitos vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo, onde diferenciam-se em formas flageladas e são posteriormente inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado (GONTIJO; CARVALHO, 2003).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Leishmania* spp..

**Fonte:** Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013.

A forma clínica de como a LTA se manifesta está associada à resposta imune do hospedeiro e das espécies infectantes de *Leishmania* spp. (JARA et al., 2013).

De acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar disponibilizado pelo Ministério da Saúde no ano de 2017, a identificação das espécies é um dos fatores que deve ser levado em consideração na definição do curso do tratamento de casos confirmados com a doença. Essa nova manobra para se definir o curso de tratamento aumenta a necessidade da implementação de técnicas de biologia molecular, que nos permite identificar o DNA do parasito, permitindo assim a identificação das espécies.

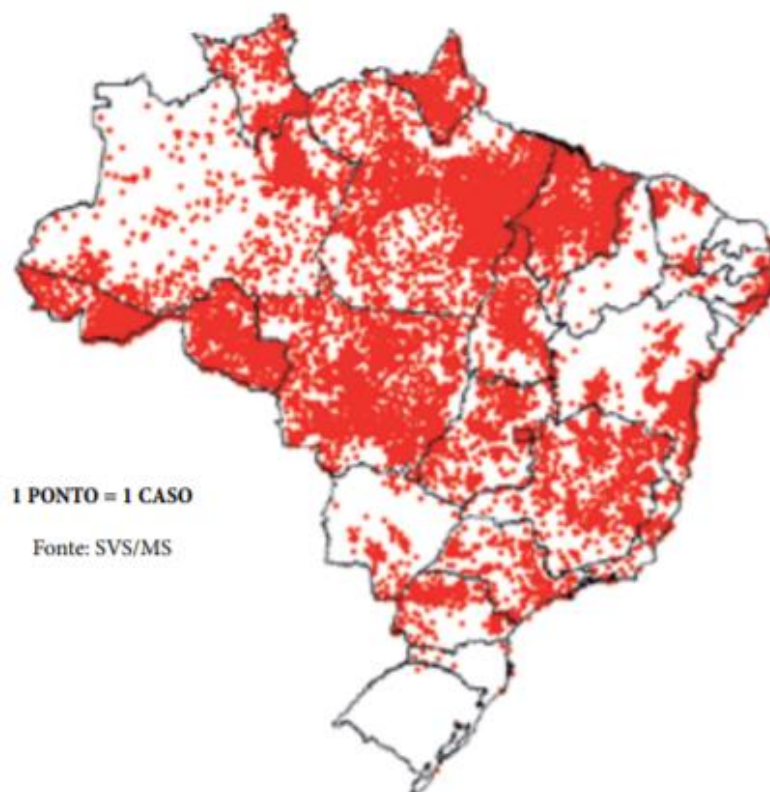
Um método diagnóstico preciso e que permita a diferenciação entre as espécies de *Leishmania* ainda não foi descrito. Um alvo que permite a detecção do parasito com uma alta sensibilidade é o cinetoplasto de DNA (kDNA), que é uma região altamente conservada do DNA mitocondrial do parasito (CECCARELLI et al., 2014). Estudos que desenvolveram ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional ou PCR em tempo real, utilizando o kDNA como alvo, apresentaram uma alta sensibilidade na detecção, diferenciação e na quantificação das espécies de *Leishmania* (JARA et al., 2013).

### **1.3 Epidemiologia**

A Leishmaniose Tegumentar tem uma ampla distribuição no Continente Americano, registrando casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e do Uruguai. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera que 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair esta doença. No Brasil, há registro de casos em todo o território nacional (Figura 3), e é considerada uma doença de caráter ocupacional, que possui uma diversidade de agentes, hospedeiros, reservatórios e vetores resultando em um complexo padrão de transmissão que dificulta o controle (CURTI et al., 2009; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

O avanço migratório de áreas urbanas para áreas que são o habitat natural do vetor *Lutzomyia* proporciona um aumento na proliferação e aumenta o risco de infecção por *Leishmania* na região urbana (BARCAROL et al., 2011).

A LTA é uma doença de notificação compulsória no Brasil, onde todo caso confirmado deve ser notificado e investigado pelos serviços de saúde. A notificação permite quantificar os casos de pessoas afetadas pela LTA.



**Figura 3.** Casos de LTA descritos ao longo do território brasileiro em 2015.  
**Fonte:** Brasil, 2017.

No entanto, os casos notificados oficialmente não simulam a situação real da evolução da doença em determinadas regiões. A demora para procurar o sistema de saúde e o difícil diagnóstico são alguns dos motivos que tornam a notificação tão difícil (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

#### **1.4 Clínica da leishmaniose**

As manifestações clínicas de LTA apresentam um amplo espectro de sinais e sintomas, que acabam por tornar o reconhecimento da doença ainda mais difícil. Considerando a área afetada pela picada do flebotomíneo e a espécie responsável pela infecção, a manifestação pode acontecer, principalmente, de três formas: cutânea-mucosa, cutânea ou mucosa (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010; CERUTTI et al., 2017).



### 1.4.1 Leishmaniose cutânea (LC)

Uma úlcera típica de LC localiza-se em áreas expostas da pele e no geral é indolor (Figura 4). Apresenta um formato ovalado ou arredondado, com base eritematosa, infiltrada e com bordas delimitadas e elevadas. Quando não tratadas, as lesões podem progredir para cura espontânea ou permanecer ativas por vários anos, levando ao comprometimento mucoso (BRASIL, 2017).



**Figura 4.** Lesão de LC em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.  
**Fonte:** Hospital Universitário de Brasília – HUB, 2017.

A LC pode ser classificada dentro das seguintes formas clínicas:

- **Leishmaniose cutânea localizada:** apresenta-se no estágio inicial com um ponto eritematoso no local onde ocorreu a picada do flebotomíneo. A evolução acontece ao longo de 12 semanas e leva ao desenvolvimento de uma pápula. No período de 6 meses ocorre formação da úlcera (Figura 5). Podem aparecer uma ou várias lesões (GUIMARÃES et al., 2005).



**Figura 5.** Lesão de LC localizada em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.  
**Fonte:** Hospital Universitário de Brasília – HUB, 2017.

- **Leishmaniose cutânea disseminada:** a forma cutânea disseminada ocorre em 2% dos casos. Apresenta lesões papulares com aparência acneiforme, porém é caracterizada pelo surgimento de mais de 10 lesões podendo chegar a centenas. A disseminação provável por via hemática ou linfática é posterior ao surgimento das primeiras lesões, que possuem características semelhantes à LC localizada. Essa forma clínica também é conhecida por desenvolver lesões na mucosa simultâneas à lesão de pele (Figura 6) (BRASIL, 2017; CERUTTI et al., 2017).



**Figura 6.** Lesão de LC disseminada em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.  
**Fonte:** Hospital Universitário de Brasília – HUB, 2016.

- **Leishmaniose cutânea difusa:** é a forma clínica rara e grave causada pela *L. amazonensis*. Desenvolve-se em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* e anergia. Manifesta-se com uma única lesão ou extensas placas difusas, que quase nunca apresentam ulceração (Figura 7) (VIANA et al., 2013).



**Figura 7.** Lesão de LC difusa.  
**Fonte:** Brasil, 2017.

- **Forma recidiva cútis:** após a cicatrização da lesão inicial, ocorre a ativação da lesão nas bordas mantendo o fundo cicatricial (BRASIL, 2017).

#### 1.4.2 Leishmaniose mucosa (LM)

A forma mucosa está fortemente associada à espécie de *L. braziliensis*, e são encontradas lesões ulceradas nas mucosas das vias aéreas superiores, quase sempre associadas às deformidades na face. A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea (GOMES et al., 2014). As condições que favorecem o avanço da LC para LM ainda não são totalmente conhecidas, porém um tratamento primário inadequado e a demora da cicatrização da lesão inicial, são fatores que contribuem para o desenvolvimento da LM. Na maioria dos casos a LM atinge a mucosa nasal com acometimento do septo ou a mucosa oral, e ambas apresentam um alto risco de levarem a deformidades permanentes (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GARBIN et al., 2017).

#### 1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da LTA consiste em uma associação de critérios clínicos e laboratoriais, porém ainda não foi estabelecido um exame que possa ser considerado o padrão ouro para o diagnóstico da doença (GOMES et al., 2014). As técnicas laboratoriais envolvem exames parasitológicos e imunológicos. Os exames parasitológicos englobam a busca direta do parasito, o isolamento do mesmo em cultura e o histopatológico. São exames que apresentam boa especificidade, mas uma sensibilidade insatisfatória. O exame imunológico é representado pela Intradermorreação de Montenegro (IDRM), e o sorológico pela Imunofluorescência Indireta (IFI), ambos caracterizados pela variável sensibilidade, e uma baixa especificidade diagnóstica (SILVA et al., 2012; GOMES et al., 2014; BONI et al., 2017).

Estudos revelaram que técnicas de biologia molecular, principalmente a PCR, agregam boa sensibilidade, especificidade e melhor acurácia em comparação aos exames imunológicos e parasitológicos. Nesse contexto, o emprego de técnicas baseadas em PCR no diagnóstico de Leishmaniose tem se mostrado bem promissoras (SILVA et al., 2012; SATOW et al., 2013; BONI et al., 2017).

A qPCR vem sendo utilizada na análise quantitativa do protozoário na lesão de LTA. Esta análise é útil na monitoração da resposta à terapia leishmanicida (JARA et al., 2013). Em estudos, foram demonstrados que *swabs* superficiais na lesão apresentavam maiores quantidades de *Leishmania* que esfregaços a partir de uma

amostra de biópsia, porém, não foi acertada a variação dessa quantificação conforme a profundidade da lesão (SHARQUIE; HAMEED, 2012). Apesar de a maioria dos estudos relatarem a pesquisa do parasito a nível dérmico, o envolvimento subcutâneo, ou seja, a lesão na camada adiposa, parece ser um importante achado na LTA (NEUVIANS et al., 2005).

Uma técnica de coleta adequada também é essencial para aumentar a acurácia no diagnóstico de LTA. Recentes estudos demonstraram que existem variações na quantidade de protozoários encontrados, dependendo do sítio de coleta e método aplicado. Mesmo em técnicas de alta sensibilidade, como a qPCR, pode-se alcançar variações em sensibilidade e especificidade, decorrentes da técnica e do local da lesão onde foi coletada a amostra (SHARQUIE; HAMEED, 2012).

## 1.6 Tratamento

A droga de primeira escolha é o antimônio pentavalente (Sb+5) (Quadro 1), que encontram-se disponíveis como antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, sendo que o último não é comercializado no Brasil. Recomenda-se que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb + 5 / kg / dia (BRASIL, 2017). O tempo de tratamento depende da forma clínica, e em alguns casos os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de vários outros esquemas terapêuticos (PELLISSARI et al., 2011).

A anfotericina B e Isotionato de pentamidina são as drogas de segunda escolha para o tratamento de LC quando os pacientes estão infectados por *L. braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*. São medicamentos indicados quando ocorrem caso de contraindicação ou resistência aos antimoniais (LIMA et al., 2007; BRASIL, 2017).

A anfotericina B e pentamidina são drogas nefrotóxicas e por esse motivo é indispensável a avaliação renal no caso de uso. Já os antimoniais são cardiotoxicos e tornam a avaliação do eletrocardiograma (ECG) indispensável durante o tratamento, independente da presença de fatores de risco associados (LIMA et al., 2007). Os medicamentos utilizados para o tratamento de LTA são tóxicos e podem desencadear diversos efeitos adversos, aumentando assim a necessidade de um diagnóstico preciso (PELLISSARI et al., 2011).

**Quadro 1.** Esquema terapêutico para Leishmaniose cutânea localizada.

<b>Leishmaniose Cutânea Localizada – Pacientes infectados por <i>Leishmania braziliensis</i> e outras espécies, exceto <i>L. guyanensis</i>.</b>	
<b>Forma clínica</b>	<b>Terapêutica</b>
<b>Lesão única ou múltipla</b> de qualquer tamanho e localização	<p><b>Primeira escolha</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Antimoniato de meglumina EV ou IM:</b> para pacientes de todas as regiões brasileiras, exceto aqueles com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, gestantes e com idade maior ou igual a 50 anos.</li> <li>• <b>Anfotericina B lipossomal:</b> para pacientes com idade a partir de 50 anos; com insuficiência renal, cardíaca ou hepática de qualquer idade; transplantados renais, cardíacos ou hepáticos; gestantes de qualquer idade.</li> </ul> <p><b>Segunda escolha</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desoxicolato de anfotericina B.</li> <li>• Isetionato de pentamidina, exceto em gestantes e lactantes.</li> </ul>
<b>Lesão única com até 3 cm no seu maior diâmetro</b> , em qualquer localização, exceto cabeça e regiões periarticulares, incluindo recidiva cútis e sem imunossupressão.	<p><b>Primeira escolha</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Todas as indicações de primeira escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização.</li> <li>• <u>Outra opção:</u> antimoniato de meglumina intralesional.</li> </ul> <p><b>Segunda escolha</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Todas as indicações de segunda escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização.</li> </ul>

Fonte: Brasil, 2017.

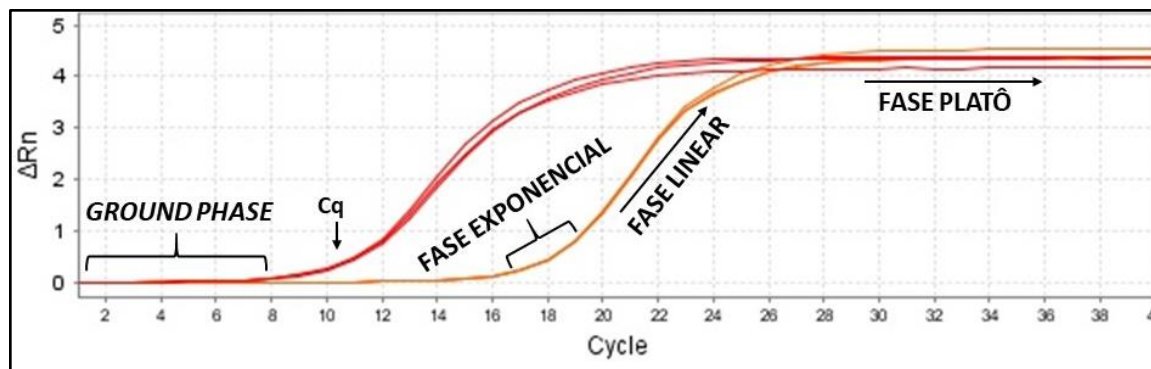
### 1.7 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica bem estabelecida para a detecção e quantificação de diferentes microrganismos, e pode ser usada com diferentes finalidades. Pelo fato de ser capaz de identificar um fragmento específico de DNA, tem sido bastante utilizada para o diagnóstico de patógenos (KRALIK; RICCHI, 2017). A utilização da qPCR no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias marca um importante avanço tecnológico (HOLLAND et al., 1991).

A qPCR baseia-se no uso de sondas ou corantes fluorescentes que permitem o acompanhamento em tempo real da amplificação de alvos desejados no DNA (ALEXANDRE, 2015). O termociclador é responsável por recolher a emissão da fluorescência e transferir esses dados para um *software* que faz a leitura final da reação (COELHO, 2013).

A qPCR possui quatro fases: *ground phase*, exponencial, linear e platô (Figura 8). O ponto em que o nível da fluorescência chega ao limiar da fase exponencial é chamado de *threshold*. O *threshold* equivale ao número de ciclos que são necessários

para que a fluorescência seja detectável pelo *software*, ou seja, para que a reação transponha o limiar estabelecido. Esse momento é chamado de *Quantification cycle* (Cq) (KUBISTA et al, 2006; COELHO, 2013).



**Figura 8.** Gráfico demonstrando uma curva de *L. braziliensis* (vermelha) e *L. amazonensis* (laranja), demonstrando o Cq e as fases *ground phase*, exponencial, linear e platô.  
**Fonte:** Acervo pessoal.

O valor de Cq é inversamente proporcional ao número de moléculas de DNA, ou seja, quanto menor o número do Cq, maior a quantidade de DNA presente na reação. Uma das formas de se quantificar o DNA é utilizar amostras com concentrações conhecidas para a elaboração de uma curva padrão, onde é realizada uma diluição seriada. A precisão no Cq dessas amostras permite que amostras com concentrações de DNA desconhecidas sejam comparadas com a curva padrão, sendo assim facilmente calculadas (COELHO, 2013).

O SYBR *Green* é um corante que se liga de forma inespecífica à fita dupla de DNA, formada durante a amplificação. É um dos corantes mais utilizados na prática. Possui cianina, que quando se liga às moléculas de DNA, emite fluorescência (ALEXANDRE, 2015).

A reação também pode ser feita utilizando o sistema *TaqMan*, que é uma sonda possuidora de um fluoróforo (reporter) ligado na extremidade 5', responsável pela fluorescência emitida, e um *quencher* localizado na extremidade 3'. A fluorescência emitida é lida pelo detector de sinal luminoso e por um amplificador de sinal a cada ciclo da amplificação, traçando um gráfico com a absorção obtida (KUBISTA et al., 2006).

A metodologia do qPCR que utiliza SYBR *Green* oferece uma ótima alternativa por apresentar um custo acessível e ser considerada de fácil aplicação. Essa metodologia apresenta a desvantagem de se ligar de forma inespecífica ao longo de

toda a cadeia de DNA, inclusive a dímeros de *primers*, levando a uma amplificação inespecífica. Para tentar corrigir essa amplificação inespecífica é feita uma análise da curva *melting* ( $T_m$ ), que corresponde ao ponto em que 50% do DNA encontra-se em fita simples. A curva *melting* varia de acordo com a quantidade de guanina-citosina presente, da temperatura de dissociação e da ordem em que se encontra a sequência de DNA (ALEXANDRE, 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

### 2.1 Justificativa

A intensa reação inflamatória gerada pela *Leishmania* spp. reduz a sensibilidade dos exames parasitológicos e das técnicas de biologia molecular. Deve-se considerar também que a falta de acesso à saúde da população afetada atua como um entrave para o diagnóstico utilizando técnicas altamente sensíveis. Os conceitos previamente expostos e a toxicidade dos tratamentos disponíveis justificam a busca frequente por técnicas mais precisas e menos invasivas no reconhecimento da LTA. Nesse estudo, utilizamos a qPCR para quantificar o kDNA de *Leishmania* spp. na epiderme, derme superior, inferior e no tecido subcutâneo de pacientes com LTA. Tendo como finalidade apresentar a melhor profundidade em que a biópsia deve ser realizada nas lesões e aumentar a acurácia do teste de qPCR para o diagnóstico de LTA.



### **3. HIPÓTESE DO ESTUDO**

Camadas de pele mais superficiais, ou seja, amostras menos invasivas apresentariam uma maior quantidade de parasitos que amostras mais invasivas. Consequentemente, amostras coletadas em regiões mais superficiais aumentariam a sensibilidade e acurácia para os testes moleculares e parasitológicos no diagnóstico da LTA.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Identificar a melhor profundidade para detecção de *Leishmania* spp. nas diferentes camadas da pele em lesões cutâneas de LTA.

### **4.2 Objetivos específicos**

- A. Quantificar protozoários do gênero *Leishmania* na porção epidérmica, dérmica superior, dérmica inferior e no subcutâneo das bordas de úlceras cutâneas de lesões de LTA;
- B. Testar a acurácia diagnóstica da qPCR nas diferentes camadas da pele;
- C. Discutir sobre a técnica de biópsia mais adequada (profundidade necessária) para o diagnóstico da LTA.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1 Local e período do estudo**

O presente estudo está em conformidade com o STARD 2015 (Anexo 1), que contém uma lista atualizada de itens essenciais para estudos de precisão diagnóstica (BOSSUYT et al., 2015). Os pacientes foram recrutados no ambulatório de Leishmaniose do Hospital Universitário de Brasília - HUB de julho de 2016 a junho de 2017.

### **5.2 Cálculo amostral**

A população alvo foi definida com base na quantidade de pacientes com suspeita clínica de LTA que frequentaram a clínica de dermatologia no HUB, durante o período de um ano. A prevalência estimada de LTA nesta população foi de 60%. Utilizando tabelas e fórmulas, o limite de confiança mínimo aceitável inferior foi de 0,5 ( $1 - \alpha$ ) (FLAHAULT; CADILHAC; THOMAS, 2005). Dessa forma, foi recomendada a inclusão mínima de 20 pacientes com LTA e 13 controles.

### **5.3 População estudada**

Foram incluídas, consecutivamente, amostras de pele de pacientes com suspeita de LTA e que realizaram previamente o diagnóstico clínico para inclusão. Os critérios diagnósticos (padrão ouro) de LTA seguiram especificações previamente descritas por Gomes e colaboradores em 2014, por meio da definição do padrão composto de referência (diagnóstico clínico, sorológico, parasitológico e molecular).

### **5.4 Critérios para alocação no grupo com LTA**

Os pacientes foram alocados para o grupo com LTA quando apresentaram pelo menos um teste parasitológico (esfregaço, cultura ou histopatológico com presença de formas amastigotas) ou molecular positivo (PCR). Alternativamente, os pacientes também foram alocados para o grupo LTA quando apresentaram um exame histopatológico compatível ou uma IFI positiva, sem qualquer confirmação de um

diagnóstico diferencial, e uma resposta completa ao tratamento específico (antimonial pentavalente).

### **5.5 Critérios para alocação no grupo controle**

Os pacientes foram alocados para o grupo controle (doenças que fazem diagnóstico clínico diferencial com a LTA) quando nenhuma das condições acima foram cumpridas, e o diagnóstico diferencial alternativo foi confirmado pela cultura e exame histopatológico compatível com outras doenças causados por micobactérias e fungos.

### **5.6 Critérios de exclusão**

Foram excluídos pacientes que apresentaram alguma das características descritas abaixo:

- Menores de 18 anos;
- Não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1);
- Pertencentes a comunidades indígenas;
- Histórico de Leishmaniose mucosa (LM);
- Previamente tratados para Leishmaniose há menos de 1 ano;
- Pacientes imunossuprimidos (uso de drogas imunossupressoras ou doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida).

### **5.7 Exames realizados**

Após a suspeita clínica todos os pacientes foram submetidos aos exames:

- Imunofluorescência indireta;
- Cultura do aspirado da lesão;
- Esfregaço;
- Histopatológico de fragmento de pele total;
- PCR convencional de fragmento de pele total;
- PCR em tempo real (teste índice) das camadas da pele separadas.

## 5.8 Exames e procedimentos realizados para a classificação dos pacientes

### 5.8.1 Imunofluorescência indireta (IFI)

As amostras de sangue venoso coletadas dos pacientes foram enviadas ao Laboratório do Centro de Saúde Pública do Distrito Federal - Lacen, onde o exame é realizado após a separação do soro.

O exame de IFI consiste na detecção de anticorpos contra *Leishmania* no soro humano. É um teste que se baseia na reação de soros com a presença dos parasitos (*Leishmania*), quando em contato com o soro humano. A reação é evidenciada após a adição de um conjugado fluorescente, com anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína, produzido pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), pré-diluído 1:150 em solução de Azul de Evans a 0,1%. Após a preparação do material, a leitura é feita por fotomicroscopia, e a IFI é considerada positiva quando apresenta titulações iguais ou superiores a 1:40 (GOMES, 2014).

### 5.8.2 Cultura do aspirado da lesão

Foi realizado um aspirado da borda da lesão com seringa estéril de 1mL contendo 500µL de solução salina acrescida com gentamicina a 0,2% (Figura 9). O aspirado era imediatamente dividido em dois tubos contendo o meio de cultura NNN (*Novy, Neal, Nicolle*) modificado (Figura 10), e incubados em estufa de 24-26°C (SILVA, 2012). A pesquisa das formas promastigotas foi realizada em microscópio invertido (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha), durante 30 dias após a realização.



**Figura 9.** Aspirado da borda da lesão em caso atendido no ambulatório de Dermatologia.  
**Fonte:** Hospital Universitário de Brasília – HUB, 2018.



**Figura 10.** Tubos de cultura de NNN modificado.  
**Fonte:** Acervo pessoal.

### 5.8.3 Fragmento de pele para exame de esfregaço, histopatológico, PCR convencional (classificatório) e PCR em tempo real (qPCR) (teste índice)

A biópsia incisional foi realizada após assepsia, antissepsia (realizada com clorexidina alcoólica 0,5%) e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O local escolhido para obtenção da amostra foi a borda da lesão (Figura 11). O fragmento foi coletado por biópsia incisional de 0,5 x 0,5cm, e dividido em três partes destinados ao esfregaço, histopatológico e a PCR (convencional e tempo real).



**Figura 11.** Local escolhido para retirada do fragmento de pele em caso atendido no ambulatório de Dermatologia do HUB.

**Fonte:** Hospital Universitário de Brasília – HUB, 2017.

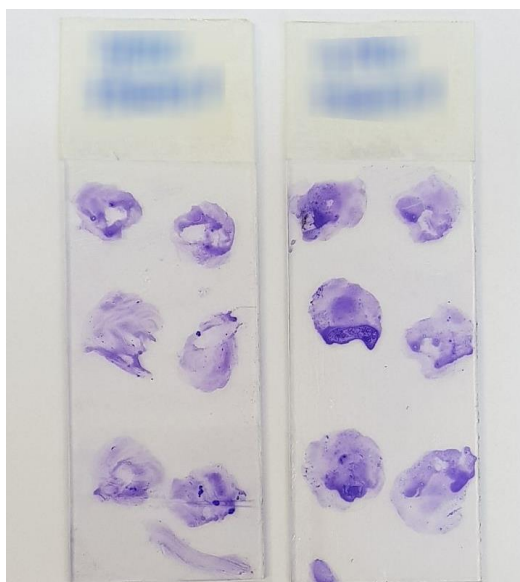
#### 5.8.4 Histopatológico

Após coleta, o fragmento foi conservado em 20mL de formol 20% e destinado ao setor de Anatomia Patológica do HUB. O histopatológico foi considerado positivo com base em dois critérios, quando ocorreu a visualização das formas amastigotas do parasito e quando constatada a presença de alterações cutâneas compatíveis com LTA (erosão, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e linfo-plasmo-histiocitária) (GOMES, 2014).

#### 5.8.5 Esfregaço

Com o fragmento destinado ao esfregaço, foram realizados seis *imprints* em duas lâminas de borda fosca. As lâminas foram fixadas com álcool metílico e coradas com *Giemsa* (Figura 12).

Após coradas, a pesquisa de forma amastigota do parasito de *Leishmania* foi realizada por microscópio óptico em objetiva de imersão com aumento de 1000x. O exame foi considerado positivo quando observada presença de formas amastigotas (SILVA, 2012).

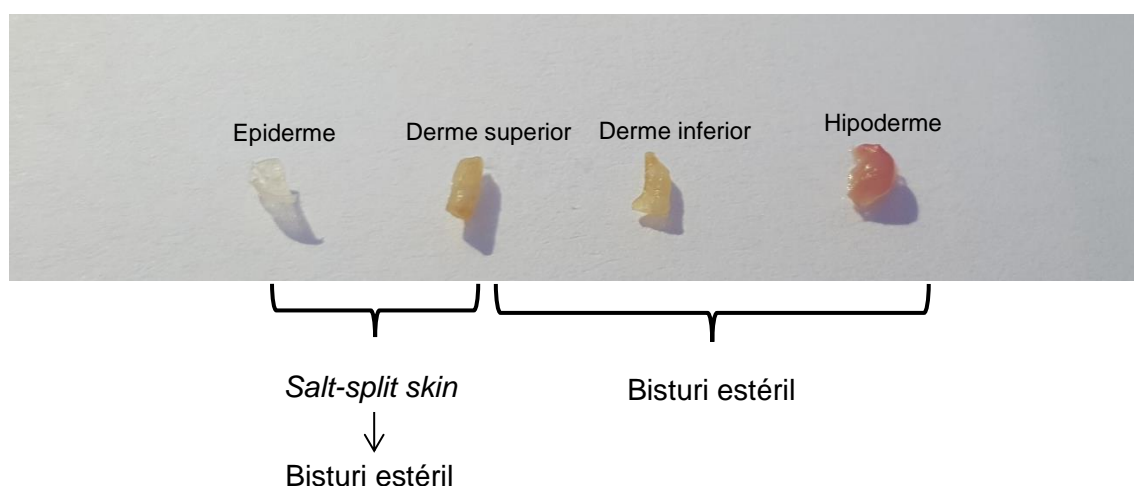


**Figura 12.** Lâminas de pesquisa de amastigotas coradas com *Giemsa*.  
**Fonte:** Acervo pessoal.

### 5.8.6 Técnica de *salt-split skin*

Um fragmento de pele coletado foi dividido, de forma transversal, em quatro partes assim denominadas: epiderme, derme superior, derme inferior e hipoderme.

A separação da epiderme da derme superior, foi realizada pela técnica de *salt-split skin* que consiste em incubar a pele normal humana em solução de cloreto de sódio a 1,0M (NaCl 1,0M) de 72 a 120 horas, a 4°C (ABHISHEK; RAGHAVENDRA; BALACHANDRAN, 2010). Após a técnica, as mesmas foram separadas com o auxílio de bisturi estéril. A separação das demais camadas ocorreu de forma visual por bisturi estéril (Figura 13).



**Figura 13.** Separação da epiderme, derme superior, derme inferior e hipoderme.  
**Fonte:** Acervo pessoal.

### 5.8.7 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada pelo Kit comercial NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL, GmbH & Co. KG, Düren, Alemanha).

### 5.8.8 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Biociências da UnB, no espectrofotômetro Nanovue™ plus (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).



### 5.8.9 PCR convencional

Um *pool* das camadas da pele anteriormente separadas foi feito para realizar a PCR convencional. O *primer* foi escolhido para amplificar a região intergênica ITS1 do gene rRNA (PR 280: 5'- CTGGATCATTTTCCGATG -3' e PR281: 5'- TGATACCACTTATCGCACTT -3') (SANCHES et al., 2016). As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Esco Swift-Maxpro (Horsham, PA, USA) com um volume final de 30µL. As reações de amplificação e a solução de trabalho foram realizadas como descritas na tabela 1 e 2. O amplificado foi visualizado sobre gel de agarose a 2% corado com GelRed (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Jaguará, São Paulo ).

**Tabela 1.** Reagentes e condições utilizadas para a PCR da região ITS1.

Reagentes	Concentração	Sistemas
Tampão	10X	6µL
dNTP's	2mM	3µL
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1,8µL
PR280	10mM	1,0µL
PR281	10mM	1,0µL
Taq DNA polimerase	5U/µL	0,5µL
Água ultrapura	---	11,7µL
DNA	100ng	5µL
Volume final	---	30µL

**Tabela 2.** Ciclos utilizados para a amplificação da região ITS1.

Étapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	1 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	
Anelamento	56°C	30 s	35x
Extensão	72°C	40 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

## 5.9 Teste avaliado (teste índice)

### 5.9.1 PCR em tempo real (qPCR)

Os ensaios qualitativos e quantitativos de qPCR foram realizados utilizando SYBR *Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e *primers* para amplificar o kDNA dos subgêneros *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Leishmania*) do parasito. Os *primers* escolhidos PPf-5'- GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3' e PPr-5'- GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3', resultaram em um produto amplificado de 120pb (PITA-PEREIRA et al., 2012). As reações foram realizadas com um volume final de 10µL, e de acordo com a tabela 3. A amplificação foi feita com uma temperatura inicial de 95° por 20s, seguida de 40 ciclos de 95° por 3s, 55° por 10s e 60° por 30s (Tabela 4). As amplificações foram processadas utilizando o termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O *melting* foi processado com incrementos de 0,3°C a partir de 55°C a 95°C.

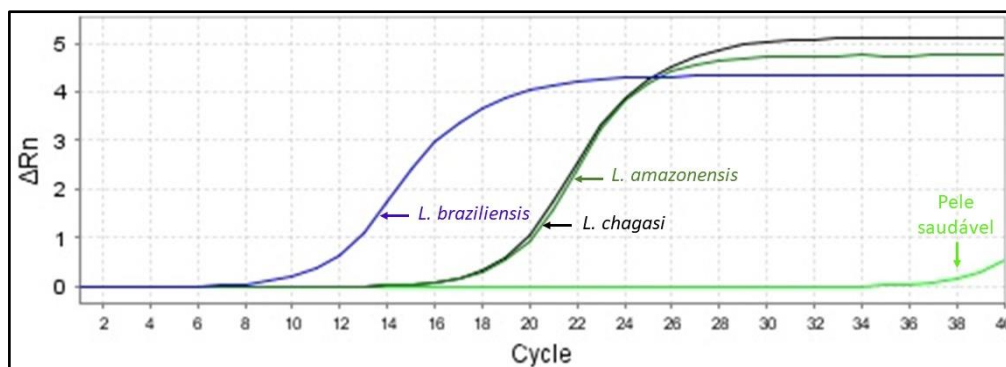
**Tabela 3.** Reagentes e condições utilizadas para a amplificação do *primer* PPr e PPf.

Reagentes	Concentração	Sistemas
SYBR <i>Green</i> PCR master mix	1X	5µL
PPr	1mM	0,2µL
PPf	1mM	0,2µL
Água ultrapura	---	0,6µL
DNA	10ng	4µL
Volume final	---	10µL

**Tabela 4.** Ciclos utilizados para a amplificação do *primer* PPr e PPf.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	20 s	---
95°C	3 s	
55°C	10 s	40x
60°C	30 s	

Todas as reações foram realizadas usando cultura de *Leishmania* (*V.* *braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300), *Leishmania* (*L.* *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania* (*L.* *chagasi* (MCER/BR/79/M6445) como controles positivos, controle negativo, extraído de pele sadia (fragmento total) e água ultrapura (Figura 14).

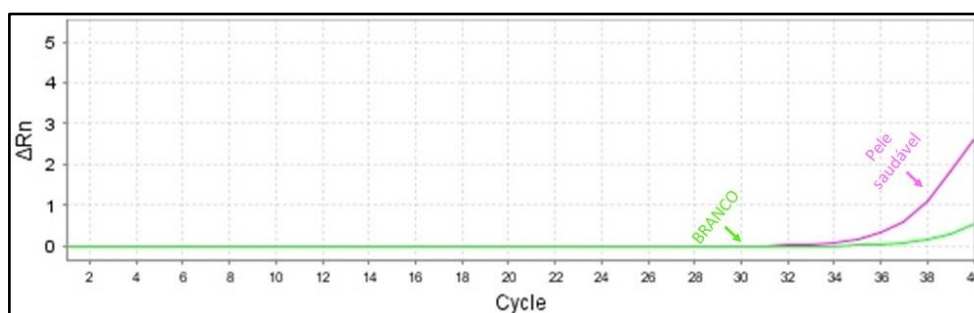


**Figura 14.** Curvas de amplificação realizadas com controles positivos: verde escuro = cultura de *Leishmania* (*L.* *amazonensis* (Cq média = 16.33), preto = *Leishmania* (*L.* *chagasi* (Cq média = 16.44) e roxo = *Leishmania* (*V.* *braziliensis* (Cq média = 9.28), e controle negativo de pele sadia em verde fluorescente.

**Fonte:** Acervo pessoal.

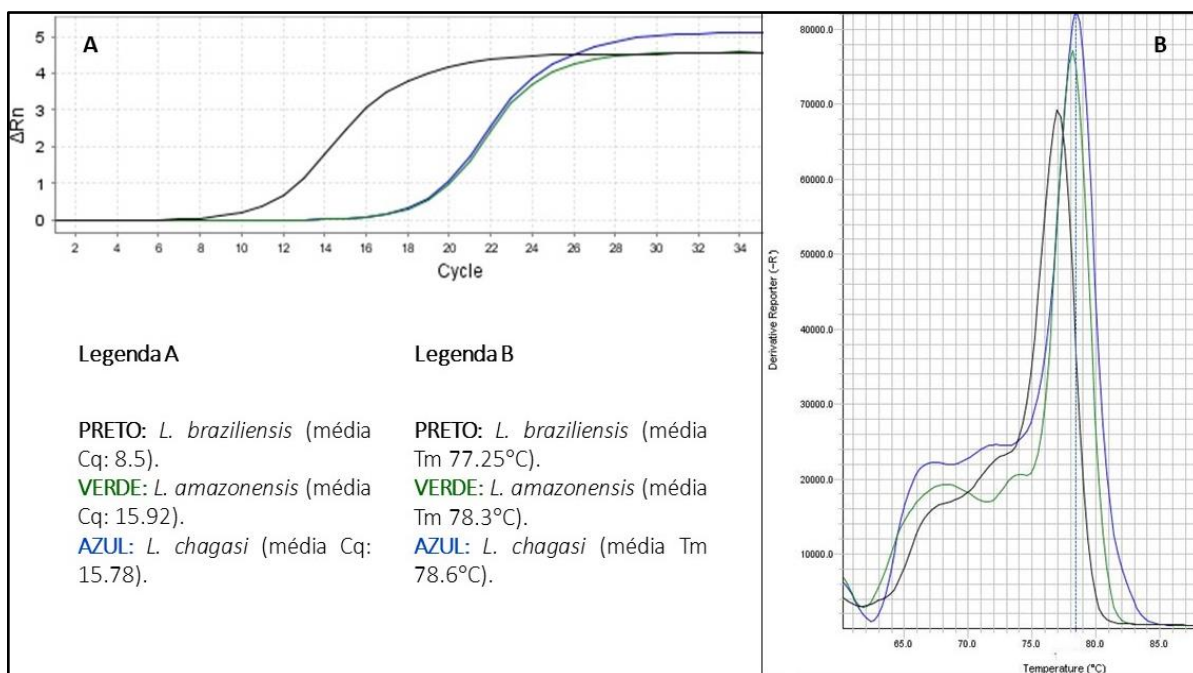
### 5.9.2 Critérios de positividade

Nos testes qualitativos iniciais, o DNA extraído de amostras de pele saudável e de água ultrapura (branco) não tiveram valores médios de Cq menores ou iguais a 33 ciclos (Figura 15). Dessa forma, antes do processamento das amostras e com base na curva padrão, um resultado positivo, limite de detecção, foi definido como amostras que apresentavam um valor de Cq menor ou igual a 31 ciclos e uma análise da curva *melting* compatível (Figura 16) (baseada na menor média alcançada nos valores de Cq dos controles, menos 2 ciclos para garantir especificidade) (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).



**Figura 15.** Demonstração de curvas do DNA de pele saudável (rosa: Cq 34.15) e branco (verde: Cq 35.45).

**Fonte:** Acervo pessoal.

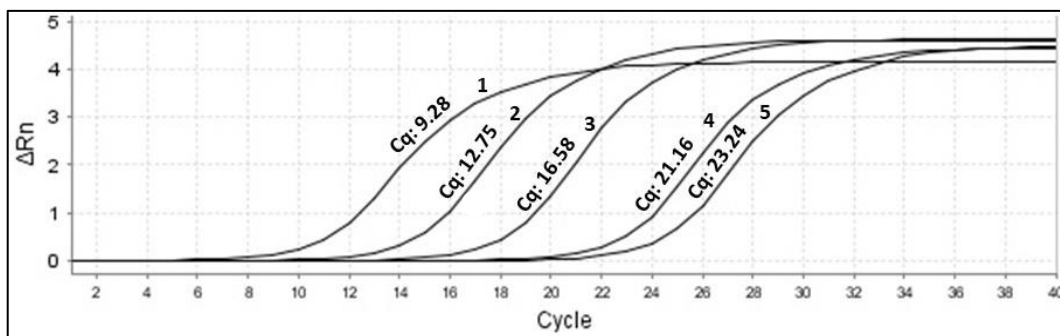


**Figura 16.** (A) Curvas de amplificação e (B) curvas *melting*, das cepas de referência utilizadas como controles positivos.

**Fonte:** Acervo pessoal.

Uma análise paralela também foi realizada classificando como paciente positivo quem apresentou DNA de *Leishmania* em pelo menos uma das camadas de pele consideradas. Estes pacientes foram alocados para a quantificação das camadas de pele. Todas as reações foram realizadas por um pesquisador responsável e cego com relação aos outros exames e às condições clínicas dos pacientes. As amostras para o padrão de referência composto e para o teste de índice foram coletadas ao mesmo tempo.

A curva padrão foi realizada em triplicata com amostras de *L. braziliensis* ( $R^2 = 0.995$ , eficiência = 93.026, declive = - 3.501) (Figura 17) (SHRIVASTAVA et al., 2011). Posteriormente a comparação com a curva padrão, a quantidade de *Leishmania* foi calculada da seguinte forma: [equivalentes de DNA de parasito por reação / quantidade de DNA de tecido por reação]  $\times 10^3$ , expressa como o número de parasitos de *Leishmania* por  $\mu\text{g}$  de DNA de tecido (SUÁREZ et al., 2015). Levando em consideração o tamanho do genoma haploide de *L. braziliensis*, foi considerado 83,15fg do DNA de *Leishmania* como sendo equivalente a um parasito (32Mb, 70fg por seu genoma diploide) (JARA et al., 2013).



**Figura 17.** Curva padrão construída com *L. braziliensis*, demonstrando a média dos Cq da diluição seriada.

**Fonte:** Acervo pessoal.

A reação mostrou um limiar de quantificação igual a  $1 \times 10^{-3}$  ng de *Leishmania* DNA por reação, que são equivalentes a 12,02 parasitos, com um valor médio de Cq = 23.24.

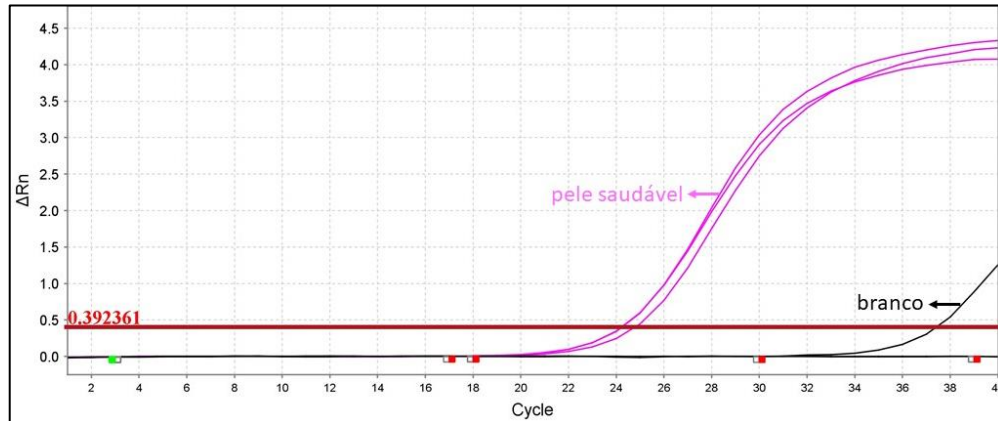
### 5.10 Reação em cadeia da polimerase / Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR - RFLP)

Foi utilizado a técnica de PCR-RFLP para a identificação do subgênero de *Leishmania*. A digestão da reação foi realizada com a enzima HaeIII e incubada no banho maria a 37°C por 1h. A reação foi formada por 5µL do amplificado e 5µL de mix (1µL da HaeIII 10U/µL, 10µL do tampão 10X e 39µL de água, para 10 amostras), resultando no volume final de 10µL. O resultado foi revelado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% (SILVA, 2012).

### 5.11 qPCR para queratina humana

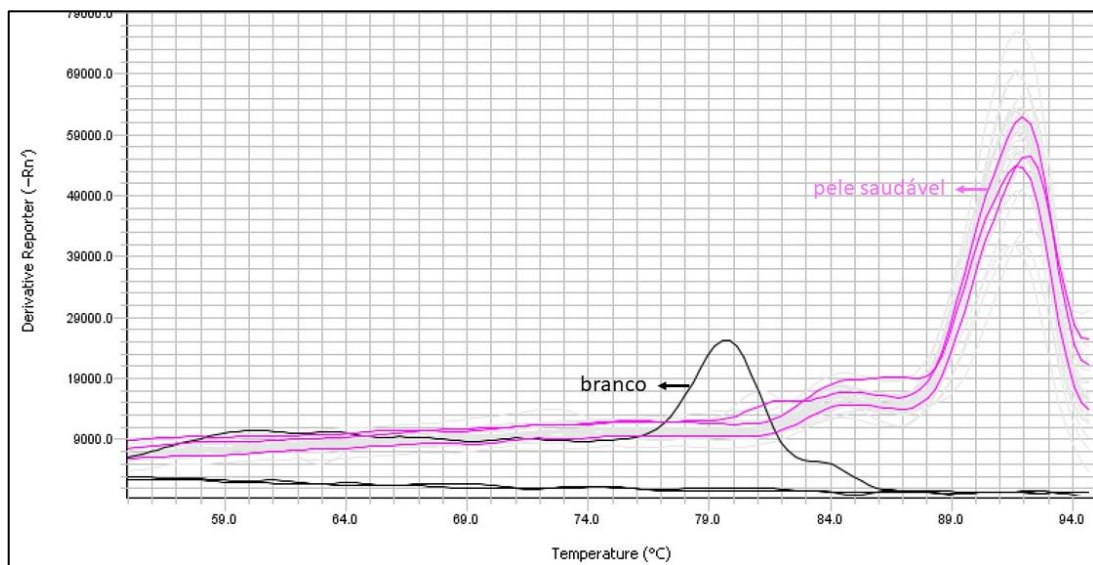
A extração de DNA foi confirmada em todas as amostras negativas por qPCR qualitativo utilizando o termociclador QuantStudio (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O par de iniciadores C18X 5'-GAA AGT GCC AGA CCC GCC CCC-3' e 5'- GCT GAA GCC ACC GCC ATAG-3', são específicos para queratina humana e resultam em um produto amplificado de 343pb (LUGASSY et al., 2006; GOMES et al., 2016). O ensaio e a amplificação foram realizados conforme descrito anteriormente nas reações para *Leishmania* spp..

Amostras de pele saudável e branco foram utilizadas como controles e realizadas em triplicatas (Figuras 18 e 19).



**Figura 18.** Curva de amplificação para confirmar extração das amostras negativas. Controle positivo em rosa (pele saudável: média Cq = 24.39) e branco em preto (média Cq = 37.36).

**Fonte:** Acervo pessoal.



**Figura 19.** Curva *melting* dos controles de pele saudável e branco. Controle positivo em rosa (pele saudável: média Tm = 91.95°C) e branco em preto (média Tm = 63.98°C).

**Fonte:** Acervo pessoal.

## 5.12 Análise estatística

Para as variáveis categóricas, as comparações foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado ou por sua versão exata. As variáveis numéricas foram

comparadas utilizando o teste U de Mann-Whitney para as variáveis demográficas e o teste de Wilcoxon para a comparação da quantificação das camadas.

Os resultados qualitativos do qPCR foram comparados usando o teste de McNemar. A análise da curva de Característica de Operação do Receptor (ROC) e a avaliação da área sob a curva (AUC) foram realizadas com base apenas nos valores de C<sub>q</sub> para fins informativos, considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%. A porcentagem de resultados positivos em pacientes com LTA foi usada para calcular a sensibilidade e a porcentagem de resultados negativos em pacientes sem LTA foi usada para calcular a especificidade. A acurácia foi calculada como a soma dos resultados verdadeiro positivo e verdadeiro negativo dividido pelo número total de pacientes avaliados. Para todas as propriedades de teste referidas, foi considerado o exato IC binomial de 95%.

Valores faltantes foram ignorados em testes não pareados e ambos os grupos que perderam correspondentes foram excluídos na aplicação de testes pareados. O programa SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) e o programa SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foram utilizados para as análises. A significância estatística foi definida como um valor de p inferior a 0,05 e o IC foi estabelecido em 95%.

### **5.13 Comitê de ética em pesquisa**

Este estudo está de acordo com a Declaração de Helsínquia e sua revisão de 2013. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CAAE: 35611714.7.1001.5558) (Anexo 2). Todo paciente foi incluído após assinatura e concordância do termo de consentimento livre e esclarecido.

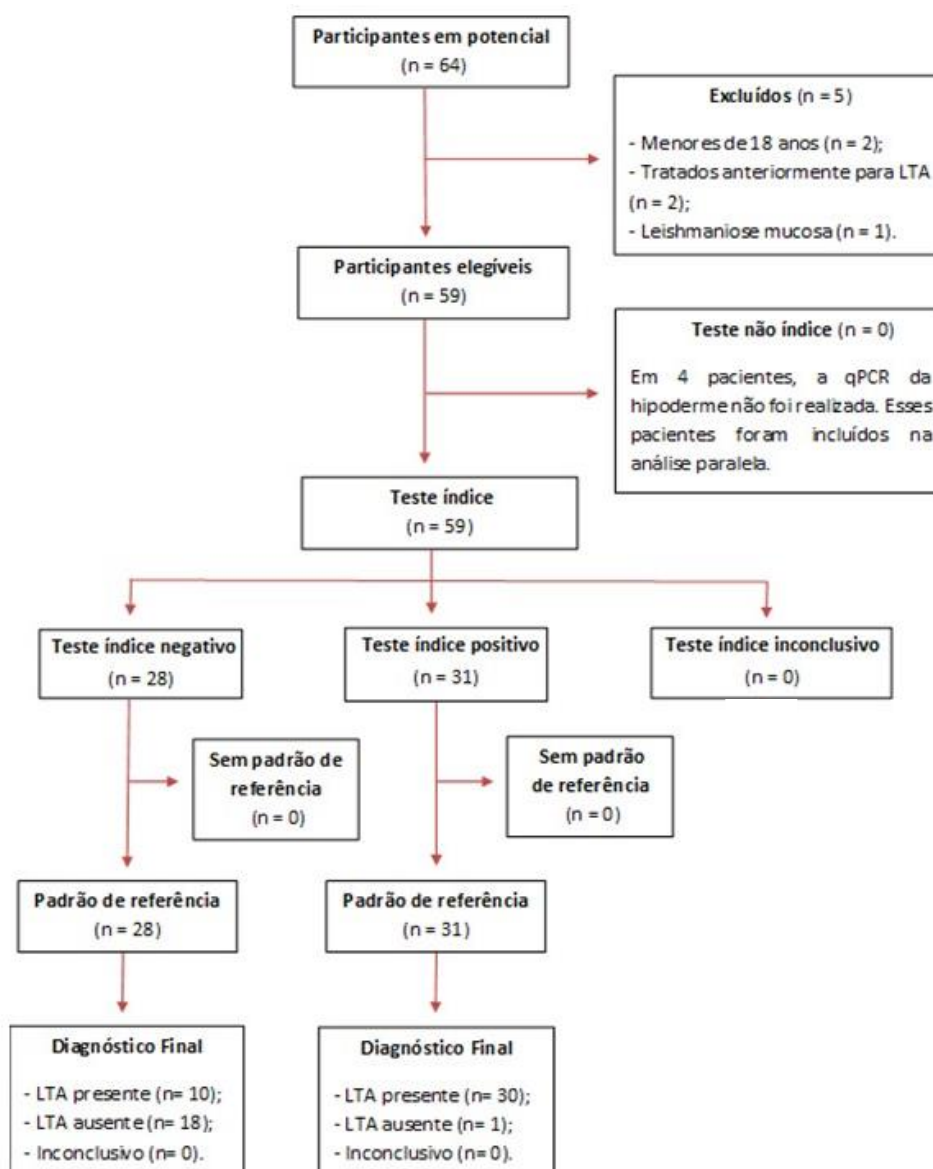
### **5.14 Análise de prontuário**

Uma análise de prontuário de todos os pacientes incluídos foi realizada posteriormente à coleta do material biológico, com a finalidade de preencher uma ficha clínica (adaptada da ficha clínica do HUB) para a coleta de dados epidemiológicos e resultados dos exames utilizados para a alocação dos grupos (Anexo 3).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características clínicas e populacionais

As amostras foram processadas no Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UnB) conjuntamente com o Laboratório de Biologia do Gene da mesma instituição. Durante o período de recrutamento, 59 pacientes foram incluídos no presente estudo, dos quais, 23 (38,9%) eram do gênero feminino e 36 (61%) do gênero masculino. Os 59 pacientes foram divididos em dois grupos: 40 alocados para o grupo LTA e 19 para o grupo controle (Figura 20).



**Figura 20.** Fluxo dos pacientes dentro do estudo.

**Fonte:** Acervo pessoal.



No grupo LTA, 14 (35%) pacientes eram do gênero feminino e 26 (65%) do gênero masculino. No grupo controle, 9 (47,4%) eram do gênero feminino e 10 (52,6%) do gênero masculino ( $p = 0,363$ ). Quatro pacientes no grupo LTA e 2 no grupo controle apresentavam histórico de tratamento para LTA ( $p = 1,000$ ). A média da idade, número e diâmetro das lesões, e tempo de doença, foram similares entre o grupo controle e o grupo LTA (Tabela 5).

**Tabela 5.** Características demográficas dos grupos controle e LTA.

	LTA	GRUPO CONTROLE	p-valor
<b>Gênero</b>			0.363
<b>Masculino, n (%)</b>	26 (65,0)	10 (52,6)	
<b>Feminino, n (%)</b>	14 (35,0)	9 (47,4)	
<b>Média de idade (QR)</b>	53,5 (26,5)	41 (28,0)	0.091
<b>Histórico de LTA, n (%)</b>	4 (1,0)	2 (10,5)	1.000
<b>Média do nº de lesões (QR)</b>	1,0 (1,0)	1,0 (1,0)	0.917
<b>Média do diâmetro das lesões (QR)</b>	2,0 (2,8)	2,0 (3,5)	0.991
<b>Média do tempo de doença (meses/ QR)</b>	2,0 (2,0)	3,0 (10,5)	0.831

**Legenda:** LTA: leishmaniose tegumentar americana / QR: intervalo quartil.

### 6.1.1 Grupo controle

Dos 19 pacientes incluídos no grupo controle, 17 apresentavam lesões com aspecto de úlceras, 1 de placa e 1 de pápula (Apêndice 2).

Neste mesmo grupo, 6 pacientes foram diagnosticados com piodermite, 3 com úlceras de estase, 4 com micose subcutânea, 1 com tuberculose cutânea, 2 com pioderma gangrenoso, 1 com carcinoma de células escamosas e 1 com infecção herpética.

### 6.1.2 Grupo LTA

Os seguintes estados brasileiros foram citados como provável área de contágio de 30 pacientes: Acre (AC), Bahia (BA), Distrito Federal (DF), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Maranhão (MA), Minas Gerais (MG) e Pará (PA).

O provável contágio de 8 pacientes ocorreu em zonas periurbanas no entorno de Brasília, nas seguintes cidades: Recanto das Emas, Setor O, Planaltina, Luziânia, Paranoá, Cidade Ocidental, Samambaia e Novo Gama. O local mais comum para o desenvolvimento das lesões foram os membros inferiores, seguido dos membros superiores. Lesões no tronco e na cabeça também foram observadas (Apêndice 3).

## 6.2 Exames classificatórios

### 6.2.1 Imunofluorescência indireta (IFI)

A IFI foi avaliada como reagente ou não reagente, e 6 resultados não foram avaliados, sendo 4 no grupo LTA e 2 no grupo controle. No grupo LTA, a sensibilidade foi de 61,11% (IC 95% 44,86 - 75,22). O grupo controle, apresentou uma especificidade de 52,94% (IC 95% 30,96 - 73,84). A acurácia do exame de IFI foi de 58,49% (IC 95% 45,09 - 70,74) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de IFI dentro dos grupos.

	LTA 36/40	Controle 17/19
<b>Reagente</b>	22	8
<b>Não reagente</b>	14	9
<b>Sensibilidade IC 95%</b>	61,11% (44,86 - 75,22)	--
<b>Especificidade IC 95%</b>	--	52,94% (30,96 - 73,84)
<b>Acurácia IC 95%</b>	58,49% (45,09 - 70,74)	

### 6.2.2 Cultura do aspirado da lesão

Foram analisados 57 resultados e 1 resultado de cada grupo não foi avaliado. O grupo LTA apresentou 28,21% (IC 95% 16,54 - 43,78) de sensibilidade. No grupo controle nenhuma cultura positivou e o teste apresentou 100% (IC 95% 82,41 - 100) de especificidade. A acurácia da cultura do aspirado da lesão foi de 58,88% (IC 95% 38,26 - 63,38) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de cultura dentro dos grupos.

	LTA 39/40	Controle 18/19
<b>Positivos</b>	11	0
<b>Negativos</b>	28	18
<b>Sensibilidade IC 95%</b>	28,21% (16,54 - 43,78)	--
<b>Especificidade IC 95%</b>	--	100% (82,41 - 100)
<b>Acurácia IC 95%</b>	50,88% (38,26 - 63,38)	

### 6.2.3 Esfregaço

Ocorreu perda de um resultado no grupo LTA, que apresentou 23,08% (IC 95% 12,65 - 38,34) de sensibilidade. No grupo controle verificou-se 100% (IC 100% 83,18 - 100) de especificidade. A acurácia do exame de esfregaço foi de 48,28% (IC 95% 35,93 - 60,84) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de esfregaço dentro dos grupos.

	LTA 39/40	Controle 19/19
<b>Positivos</b>	9	0
<b>Negativos</b>	30	19
<b>Sensibilidade IC 95%</b>	23,08% (12,65 - 38,34)	--
<b>Especificidade IC 95%</b>	--	100% (83,18 - 100)
<b>Acurácia IC 95%</b>	48,28% (35,93 - 60,84)	

#### 6.2.4 Histopatológico

No exame histopatológico foram avaliados 51 resultados. No total, 8 resultados não foram avaliados, 7 do grupo LTA e 1 do grupo controle. O grupo LTA apresentou apenas 6,061% (IC 95% 1,678 - 19,61) de sensibilidade. No grupo controle verificou-se 100% (IC 95% 82,41 - 100) de especificidade. A acurácia do teste foi de 39,22% (IC 95% 27,03 - 52,92) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia quanto à pesquisa de amastigota no histopatológico dentro dos grupos.

	LTA 33/40	Controle 18/19
<b>Positivos</b>	2	0
<b>Negativos</b>	31	18
<b>Sensibilidade IC 95%</b>	6,061% (1,678 - 19,61)	--
<b>Especificidade IC 95%</b>	--	100% (82,41 - 100)
<b>Acurácia IC 95%</b>		39,22% (27,03 - 52,92)

A avaliação quanto à compatibilidade da histopatologia, apresentou 93,94% (IC 95% 80,39 - 98,32) de sensibilidade, no grupo LTA, e 61,11% (IC 95% 38,62 - 79,70) de especificidade no grupo controle. A acurácia do teste foi de 82,35% (IC 95% 69,75 - 90,43) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia quanto à compatibilidade histopatológica dentro dos grupos.

	LTA 33/40	Controle 18/19
<b>Compatível</b>	31	7
<b>Não compatível</b>	2	11
<b>Sensibilidade IC 95%</b>	93,94% (80,39 - 98,32)	--
<b>Especificidade IC 95%</b>	--	61,11% (38,62 - 79,70)
<b>Acurácia IC 95%</b>		82,35% (69,75 - 90,43)

### 6.2.5 PCR convencional

Todos os 59 pacientes foram avaliados quanto ao exame de PCR. O grupo LTA apresentou 35% (IC 95% 22,13 - 50,49) de sensibilidade, e nenhum paciente apresentou resultado positivo no grupo controle demonstrando 100% (IC 95% 83,18 - 100) de especificidade. A acurácia do teste foi de 55,93% (IC 95% 43,29 - 67,85) (Tabela 11).

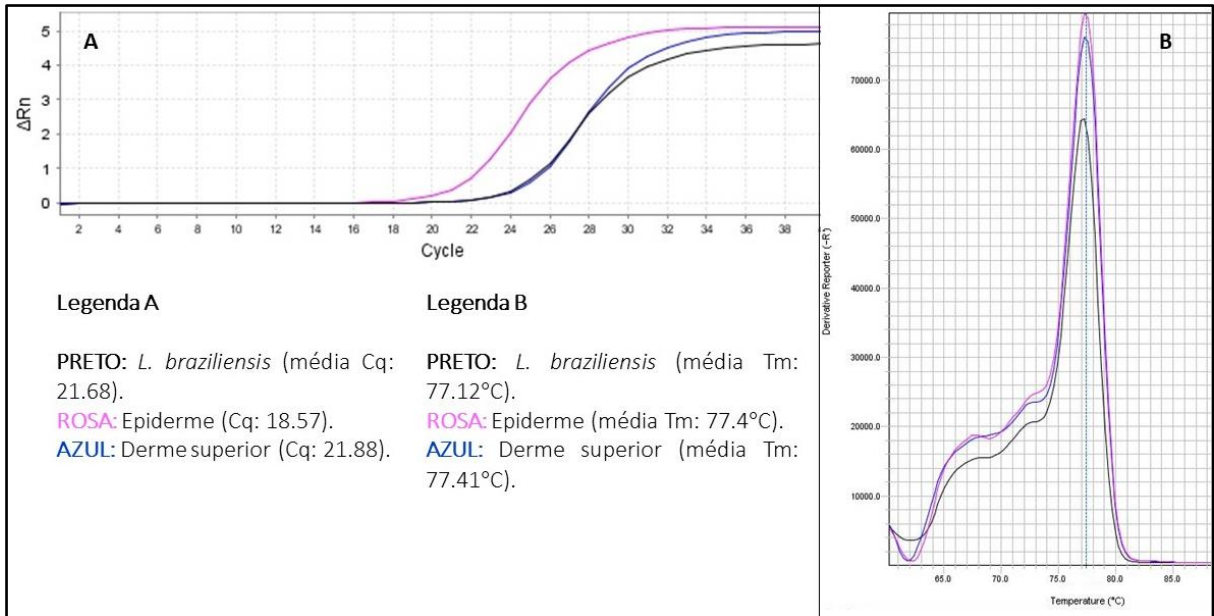
**Tabela 11.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de PCR convencional dentro dos grupos.

	LTA 40/40	Controle 19/19
<b>Positivos</b>	14	0
<b>Negativos</b>	26	19
<b>Sensibilidade IC 95%</b>	35% (22,13 - 50,49)	--
<b>Especificidade IC 95%</b>	--	100% (83,18 – 100)
<b>Acurácia IC 95%</b>		55,93% (43,29 - 67,85)

### 6.3 Exame testado

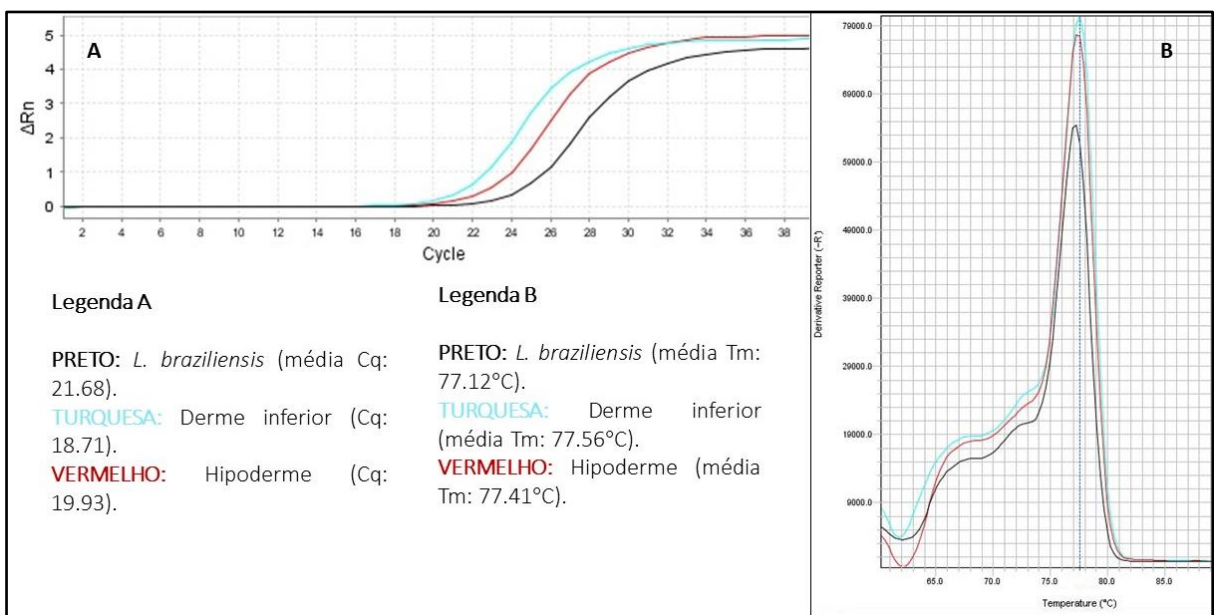
#### 6.3.1 qPCR qualitativa (teste índice)

Foram considerados positivos na qPCR, todos os pacientes que apresentaram positividade em pelo menos uma das quatro camadas da pele analisadas (Figuras 21, 22, 23 e 24).



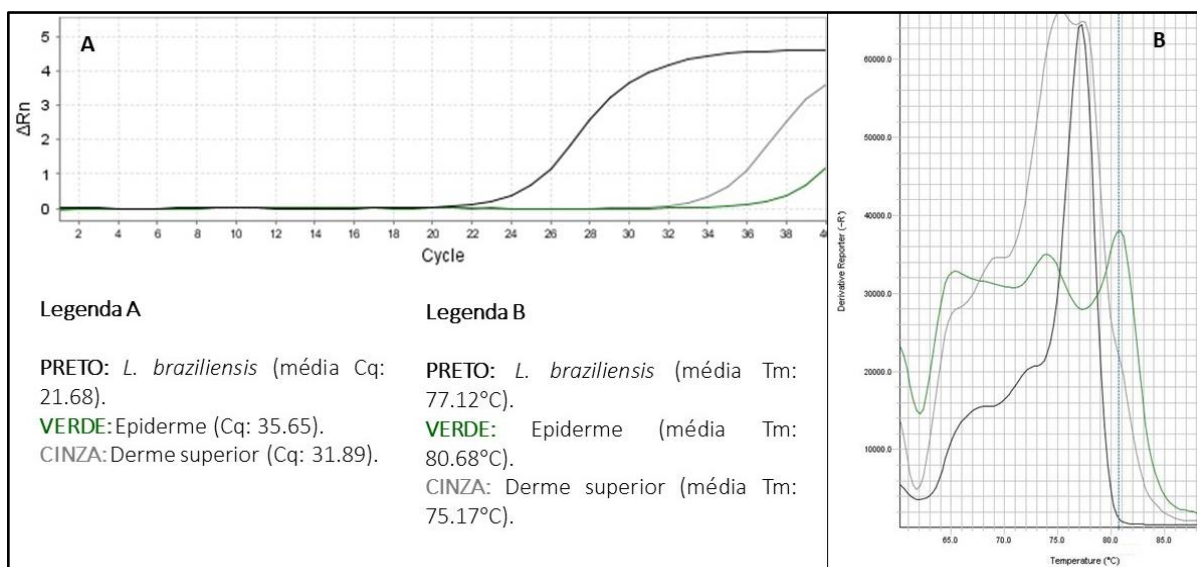
**Figura 21.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), da epiderme e derme superior do paciente 17, que demonstrou positividade nas 4 camadas de pele.

**Fonte:** Acervo pessoal.



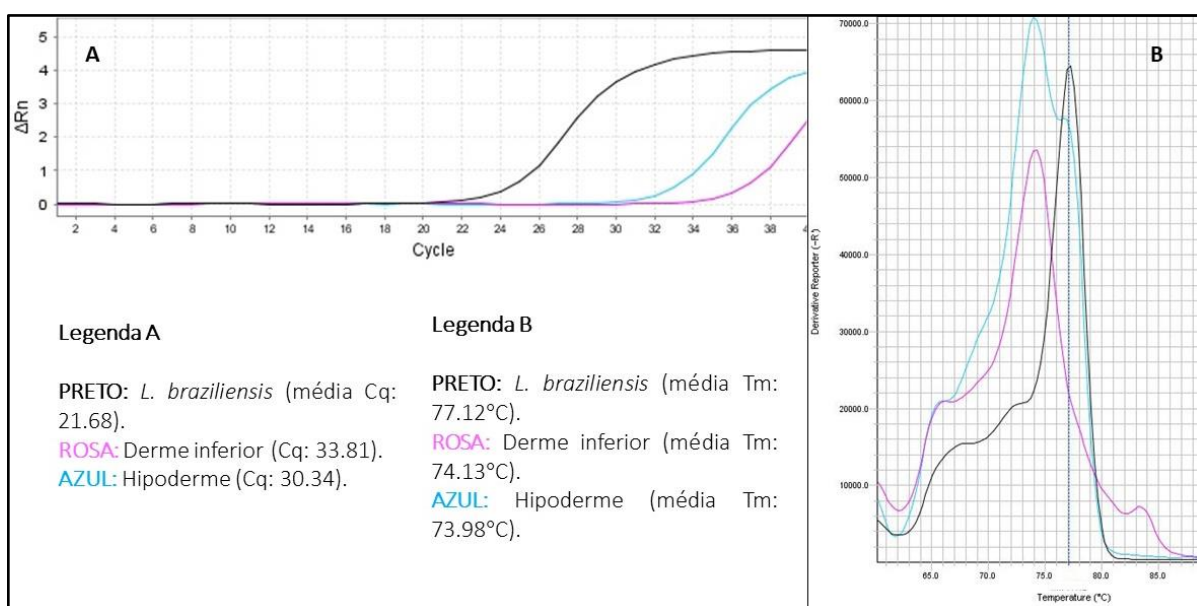
**Figura 22.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), da derme inferior e hipoderme do paciente 17, que demonstrou positividade nas 4 camadas de pele.

**Fonte:** Acervo pessoal.



**Figura 23.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), da epiderme e derme superior do paciente 23, que demonstrou negatividade nas 4 camadas de pele.

**Fonte:** Acervo pessoal.



**Figura 24.** Representação da curva de amplificação em (A) e curva *melting* em (B), derme inferior e hipoderme do paciente 23, que demonstrou negatividade nas 4 camadas de pele.

**Fonte:** Acervo pessoal.

Dos 40 pacientes incluídos no grupo LTA, 30 foram positivos, mostrando uma sensibilidade de 75% (IC 95% 59,8 - 85,8). A especificidade dentro do grupo controle foi de 94,7% (IC 95% 75,36 - 99,1). Um paciente no grupo controle apresentou resultado positivo na qPCR (Tabela 12).

**Tabela 12.** Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do exame de qPCR dentro dos grupos.

	<b>LTA 40/40</b>	<b>Controle 19/19</b>
<b>Positivos</b>	30	1
<b>Negativos</b>	10	18
<b>Sensibilidade IC 95%</b>	75% (59,8 - 85,8)	--
<b>Especificidade IC 95%</b>	--	94,7% (75,36 - 99,1)
<b>Acurácia IC 95%</b>		81,4% (69.6 - 89.3)

#### 6.4 Quantificação das camadas da pele

O número de parasitos encontrados foi maior na epiderme e na derme superior ( $159,1 \times 10^6$  e  $75,4 \times 10^6$  equivalente de *Leishmania* por  $\mu\text{g}$  de DNA no tecido, respectivamente), do que na derme inferior e hipoderme ( $54,6 \times 10^6$  e  $16,8 \times 10^6$  equivalente de *Leishmania* por  $\mu\text{g}$  de DNA no tecido, respectivamente), porém essa diferença não foi significativa ( $p > 0.05$ ) (Tabela 13).

A melhor acurácia foi alcançada na derme superior (77,9% IC 95% = 65,9 - 86,7), e foi significativamente maior que a acurácia nas amostras da epiderme e hipoderme ( $p = 0,039$  em ambas as comparações). A menor acurácia foi encontrada nas de amostras da hipoderme (63,6% IC 95% = 49,6 - 76,2). A análise estatística mostrou uma diferença significativa entre os casos e controles para qPCR de todas as camadas da pele. No grupo LTA, a maior sensibilidade alcançada foi na derme superior (67,5% IC 95% = 50,9 - 81,43). No grupo controle, a epiderme, derme superior e hipoderme alcançaram 100% (IC 95% 82,3 - 100 / 82,5 - 100 / 81,5 - 100) de especificidade (Tabela 13).

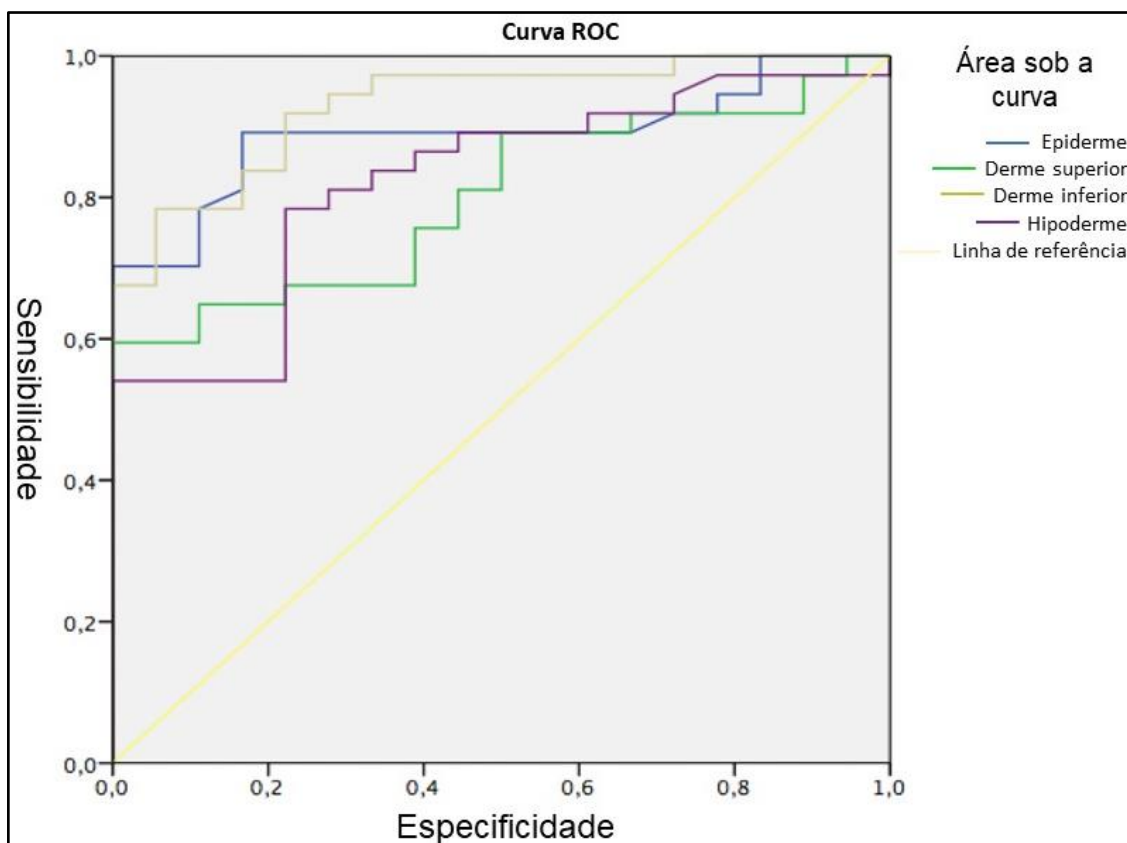
A acurácia do teste levando em consideração todos os valores de sensibilidade e especificidade das camadas da pele, foi representada pela área sob a curva (AUC), e estava acima de 0,800 em todas as camadas (epiderme: AUC = 0,886,  $p < 0,001$ , IC 95% = 0,800 - 0,971 / derme superior: AUC = 0,819,  $p < 0,001$ , IC 95% = 0,715 - 0,925, derme inferior: AUC = 0,932,  $p < 0,001$ , IC 95% = 0,867 - 0,993, hipoderme: AUC = 0,824,  $p < 0,001$ , IC 95% = 0,712 - 0,935) (Figura 25).



**Tabela 13.** Resultados da quantificação, sensibilidade, especificidade e acurácia em cada uma das camadas de pele.

	<b>Mediana/Média x 10<sup>6</sup> número de parasitos (mínimo - máximo)</b>	<b>Sensibilidade - positivo / LTA (IC 95%)</b>	<b>Especificidade - negativo / controles (IC 95%)</b>	<b>Acurácia (IC 95%)</b>
<b>Epiderme</b>	42.4/159.1	50.0% - 20/40	100.0% - 19/19	66.1%
	(4.0 - 781.7)	(35.2 - 64.8)	(83.2 - 100)	(53.4 - 76.9)
<b>Derme superior</b>	40.1/75.4	67.5% - 27/40	100% - 19/19	77.9%
	(8.0 - 244.5)	(52.0 - 79.9)	(83.2 - 100)	(65.9 - 86.7)
<b>Derme inferior</b>	26.1/54.6	62.5% - 25/40	94.7% - 18/19	72.9%
	(8.0 - 256.6)	(47.0 - 75.8)	(75.4 - 99.1)	(60.4 - 82.6)
<b>Hipoderme</b>	12.1/16.8	45.9% - 17/37	100% - 18/19	63.6%
	(8.0 - 24.1)	(31.0 - 61.6)	(82.4 - 100)	(50.4 - 75.1)

**Legenda:** Análise paralela de todas as camadas avaliadas (o resultado foi considerado positivo quando pelo menos uma camada apresentou positividade dentro dos critérios avaliados).



**Figura 25.** Ilustração do comportamento da sensibilidade e especificidade. Cálculo da área sob uma curva levando em consideração apenas os valores de Cq.

**Fonte:** Acervo pessoal.

Os  $p$  valores para a comparação quantitativa (teste Wilcoxon signed-rank) foram: epiderme x derme superior = 0.499; epiderme x derme inferior = 0.500; epiderme x hipoderme = 0.273; derme superior x derme inferior = 0.249; derme superior x hipoderme = 0.068; derme inferior x hipoderme = 0.465.

Os  $p$  valores para a comparação qualitativa (teste de McNemar) foram: Epiderme x derme superior = 0.039; epiderme x derme inferior = 0.070; epiderme x hipoderme = 1.000; derme superior x derme inferior = 1.000; derme superior x hipoderme = 0.039; derme inferior x hipoderme = 0.016.

## 6.5 Comparação dos resultados (testes classificatórios x qPCR)

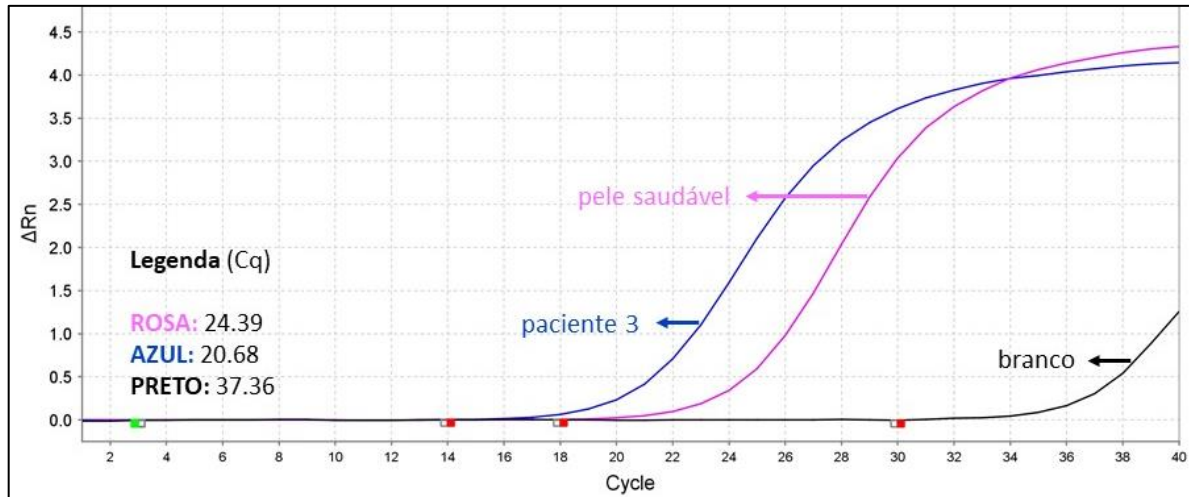
Os testes parasitológicos (esfregaço, cultura e histopatológico amastigota) apresentaram a melhor especificidade, contudo, apresentam sensibilidades muito baixas em comparação aos demais testes. A maior sensibilidade e acurácia encontrada foi no histopatológico quanto a compatibilidade (82,35% 69,75 - 90,43 IC 95%), e na qPCR (81,4% 69.6 - 89.3 IC 95%) (Tabela 14) (Apêndice 4 e 5).

**Tabela 14.** Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes classificatórios e da qPCR.

	<b>Sensibilidade IC 95%</b>	<b>Especificidade IC 95%</b>	<b>Acurácia IC 95%</b>
<b>IFI</b>	61,11% (44,86 - 75,22)	52,94% (30,96 - 73,84)	58,49% (45,09 - 70,74)
<b>Cultura</b>	28,21% (16,54 - 43,78)	100% (82,41 - 100)	50,88% (38,26 - 63,38)
<b>Esfregaço</b>	23,08% (12,65 - 38,34)	100% (83,18 - 100)	48,28% (35,93 - 60,84)
<b>Histopatológico amastigota</b>	6,061% (1,678 - 19,61)	100% (82,41 - 100)	39,22% (27,03 - 52,92)
<b>Histopatológico compatível</b>	93,94% (80,39 - 98,32)	61,11% (38,62 - 79,70)	82,35% (69,75 - 90,43)
<b>PCR convencional</b>	35% (22,13 - 50,49)	100% (83,18 - 100)	55,93% (43,29 - 67,85)
<b>qPCR</b>	75% (59,8 - 85,8)	94,7% (75,36 - 99,1)	81,4% (69.6 - 89.3)

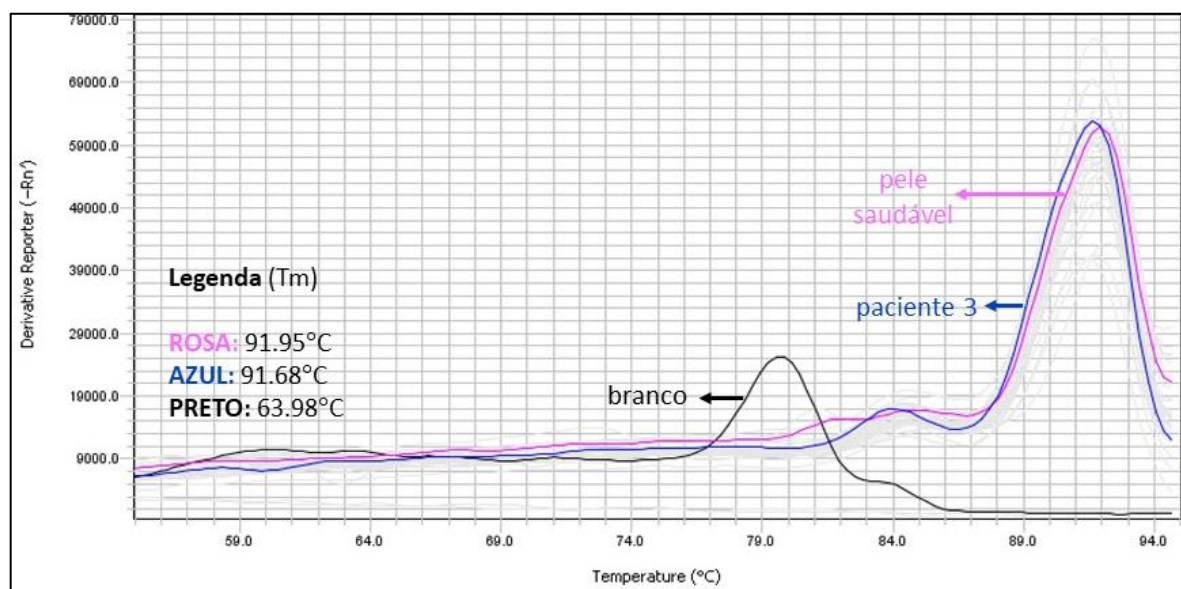
## 6.6 qPCR de queratina humana

Todas as 26 amostras que não apresentaram amplificação nos ensaios de qPCR para *Leishmania* spp., foram testadas com o *primer* de queratina humana e apresentaram amplificação, mostrando que não ocorreram problemas com as extrações das amostras (Figura 26 e 27).



**Figura 26.** Curva de amplificação do controle positivo em rosa (pele saudável), branco em preto e paciente 3 alocado para o grupo controle, em azul.

**Fonte:** Acervo pessoal.

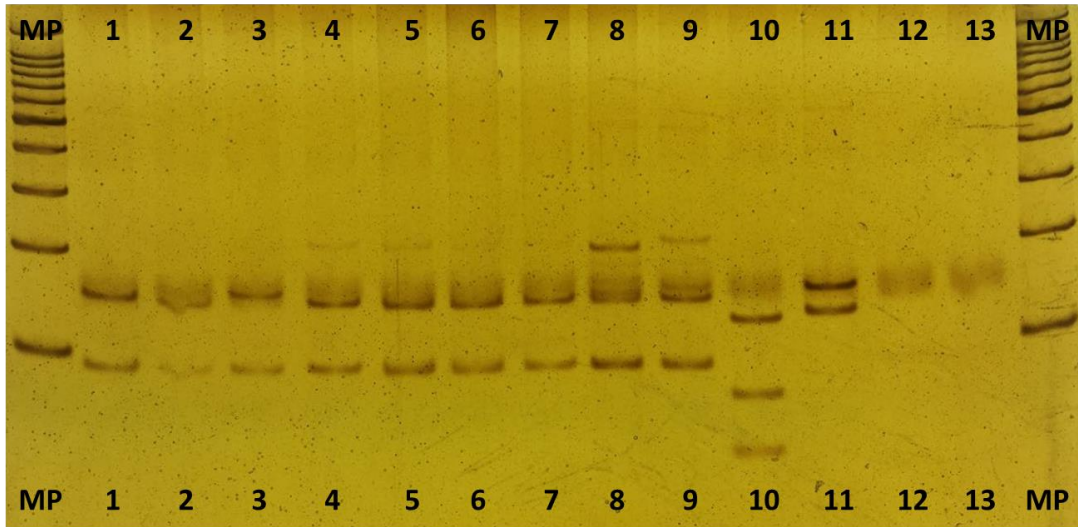


**Figura 27.** Curva *melting* de controle positivo em rosa (pele saudável), branco em preto e paciente 3 alocado para o grupo controle, em azul.

**Fonte:** Acervo pessoal.

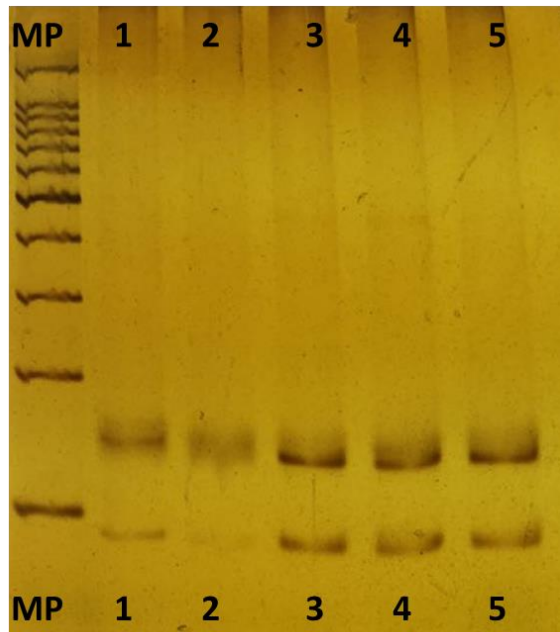
## 6.7 PCR-RFLP

Após amplificação com ITS1, 13 amostras apresentaram fragmentos amplificados de 227-268 pb e foram consideradas positivas. A digestão com HaeIII apresentou padrões de bandas compatíveis com os controles positivos de *Leishmania Viannia* nas 13 amostras positivas (Figura 28 e 29).



**Figura 28.** Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela HaeIII em amostras de pele. MP: Marcador 100pb; (1) Paciente 21; (2) Paciente 20; (3) Paciente 19; (4) Paciente 13; (5) Paciente 12; (6) Paciente 11; (7) Paciente 5; (8) Paciente 4; (9) Cultura de *L. braziliensis*; (10) Cultura de *L. chagasi*; (11) Cultura de *L. amazonensis*; (12) Água ultrapura; (13) Controle negativo de sangue.

**Fonte:** Acervo pessoal.



**Figura 29.** Produto da amplificação por ITS1 digeridos pela HaeIII em amostras de pele. (MP) Marcador 100pb; (1) Paciente 44; (2) Paciente 43; (3) Paciente 38; (4) Paciente 37; (5) Paciente 33.

**Fonte:** Acervo pessoal.

## **7. DISCUSSÃO**

### **7.1 Considerações sobre a inclusão dos pacientes**

O padrão de referência composto (diagnóstico clínico, sorológico, parasitológico e molecular), desenvolvido por Gomes e seus colaboradores em 2014, foi essencial para a alocação dos pacientes nos grupos, e principalmente para que nenhum paciente fosse falsamente diagnosticado.

A não inclusão de 5 pacientes elegíveis ao estudo ocorreu para evitar vieses no estudo e para o exato cumprimento das exigências éticas. A quantidade de pacientes do gênero masculino (65%) com o diagnóstico de leishmaniose foi maior que do gênero feminino (35%). Isso pode ter ocorrido por conta do risco ocupacional, ligado à forma de transmissão da doença, porém, perguntas que envolvem a ocupação dos pacientes não estavam presentes na ficha clínica.

É importante ressaltar que casos de LC também podem ser tratados em centros secundários de saúde, e por esse motivo a quantidade de casos confirmados aqui descritos não são os números totais reais de casos dispersos pelo Brasil.

Um viés que pode ser apontado dentro do presente estudo, foi com relação a análise de prontuários. Durante esta análise, alguns dados epidemiológicos e de resultados de exames relevantes para o estudo não foram encontrados. Acredita-se que a falta de padronização dentro do serviço de saúde para a atualização dos mesmos, pode ser o motivo para que esses dados tenham se perdido. Tal fator é conhecido e previsto para todos os estudos clínicos populacionais. O maior impacto destas perdas seria esperado para a classificação dos pacientes em LTA ou controle, mas o uso de padrão composto de referência, já que não existe único teste padrão ouro para leishmaniose, reduziu esta possível limitação.

### **7.2 Grupo controle (resultado falso positivo)**

Um paciente que havia sido tratado para LTA cinco anos antes do recrutamento, apresentou resultado positivo na derme inferior. Esse resultado pode ser explicado pelo kDNA inativo do parasito. Parasitos cultiváveis podem ser encontrados em lesões de LTA cicatrizadas anos após a cura e não indicam necessariamente recorrência (MENDONÇA et al., 2004). Esse paciente testou

negativo em todos os exames parasitológicos e na PCR convencional e não precisou de tratamento específico para melhora da LTA.

### 7.3 Padronização da qPCR

O predomínio epidemiológico no Centro-Oeste brasileiro é de *L. braziliensis*, com 3% de *L. amazonensis*, fundamentando, dessa forma a escolha dos pares de *primers* utilizados no presente estudo. Na mesma região geográfica, os métodos de qPCR que usaram *primers* específicos para a sequência de kDNA de *Leishmania Viannia* mostraram melhor precisão (GOMES et al., 2016). A vantagem do par de *primers* escolhido é a capacidade de também identificar *L. amazonensis*, um agente causal menos prevalente, mas importante causador de LTA no Centro-Oeste do Brasil (PITA-PEREIRA et al., 2012). Entretanto, no presente estudo, apenas infecções por *Leishmania Viannia* foram detectadas.

Possivelmente, padronizações futuras para a região Centro-Oeste do Brasil possam considerar o uso de testes diagnósticos em série. Acredita-se que a PCR altamente sensível e específica para *L. braziliensis* seguida de PCR igualmente sensível e específica para *L. amazonensis* em caso de negatividade da primeira possa alcançar os mais altos níveis de acurácia. Fatores como custo também devem ser levados em conta.

Acredita-se também que a padronização baseada em métodos de quantificação pode reduzir a acurácia diagnóstica da qPCR, e isso pode ter ocorrido no presente estudo. Curvas padrões menos eficientes podem ter uma lacuna maior entre o limite de detecção e à amplificação inespecífica, melhorando o desempenho e a precisão da análise com SYBR *Green*. Em um estudo anterior, foi adicionado um procedimento para a otimização após a padronização da curva padrão, aumentando a sensibilidade do qPCR (GOMES et al., 2016).

## 7.4 Exames classificatórios

Dentro dos exames classificatórios, a compatibilidade do histopatológico e a IFI foram os testes que apresentaram a maior sensibilidade (93,94% e 61,11% respectivamente), porém, esses exames isolados não são suficientes para confirmar o diagnóstico de LTA (MOMENI et al., 2013; SADEGHIAN et al., 2013). Já nos exames parasitológicos (cultura e esfregaço), histopatológico amastigota e PCR, a presença do parasito, ou DNA do mesmo, é um fator inquestionável da confirmação do diagnóstico.

Ainda é importante ressaltar que a compatibilidade do histopatológico e a IFI são achados importantes quando todos os outros exames são negativos, o que ocorreu nesse estudo em 7 casos dentro do grupo LTA (ZEYREK; KORKMAZ; OZBEL, 2007; SZARGIKI et al., 2009).

Exames parasitológicos apresentaram uma sensibilidade abaixo de 30%, e apesar de serem testes que sozinhos confirmariam o diagnóstico, a maioria dos casos de LTA, causada pela *L. braziliensis*, apresenta uma baixa carga parasitária, e por esse motivo são necessários outros exames complementares (GOMES et al., 2016).

A PCR convencional apresentou uma acurácia diagnóstica (55,93%) maior que os exames parasitológicos e o histopatológico quanto à presença de amastigotas. Porém, acredita-se que essa acurácia poderia ter sido maior se o *primer* utilizado fosse para o kDNA do parasito, como já demonstrado em estudos anteriores que foram capazes de identificar o kDNA de *Leishmania* em 98,8% das amostras (SATOW et al., 2013).

Os dados aqui encontrados estão de acordo com a literatura e reforçam a necessidade da associação dos testes histológicos, parasitológicos, imunológicos e moleculares para o diagnóstico de LTA (MOMENI et al., 2013; SADEGHIAN et al., 2013; GOMES et al., 2016;).

## 7.5 Teste índice (qPCR)

A qPCR é responsável por agregar melhor especificidade e sensibilidade que a maioria dos testes parasitológicos e imunológicos. Por esse motivo vem sendo bastante usada para o diagnóstico de doenças infecciosas (GOMES et al., 2016).



No presente estudo, a qPCR apresentou uma sensibilidade mais baixa quando comparada com outros estudos já descritos. Foram estudos que utilizaram *primers* específicos apenas para quantificar o subgênero *Viannia* (SUÁREZ et al., 2015; GOMES et al., 2016). Acredita-se que *primers* específicos dentro dos subgêneros das espécies apresentem uma melhor sensibilidade. Esse pode ter sido um dos motivos para a sensibilidade mais baixa encontrada no presente estudo quando comparado a estudos anteriores.

## 7.6 Eliminação transepidérmica

A eliminação transepidérmica tem sido documentada em várias doenças infecciosas. No entanto, sua ocorrência na LC ainda não foi totalmente elucidada (KARRAM et al., 2012). No presente estudo, a epiderme foi a camada que apresentou a maior quantidade de parasitos na quantificação.

O kDNA de *Leishmania Viannia* encontrado na epiderme de diversos casos de LTA, pode ser resultado da eliminação transepidérmica, que consiste em uma reação epidérmica contra distúrbios dérmicos, que é bem descrita em várias condições da pele (GHORPADE, 2013; YAMAMOTO; NISHIBU; EISHI, 2017). A eliminação transepidérmica pode ser parte da resposta protetora do hospedeiro, e pode ser um alvo para tratamentos tópicos (MIRANDA-VERASTEGUI et al., 2005). Na leishmaniose cutânea do Velho Mundo, a eliminação transepidérmica de *Leishmania tropica* já foi descrita, mas seu papel na LTA é desconhecido (KARRAM et al., 2012).

## 7.7 Quantificação das camadas da pele

O diagnóstico precoce é uma das formas mais eficazes de prevenir a morbidade associada à doença. Vários estudos recentes têm demonstrado a superioridade de técnicas não invasivas para o diagnóstico molecular da LTA, mas a justificativa biológica para esses resultados não foi ainda esclarecida (SUÁREZ et al., 2015).

As amostras da epiderme e da derme superior apresentaram um maior número de parasitos do que as amostras da derme inferior e hipoderme. Contudo, essa diferença não foi significativa. As amostras da derme superior demonstraram a melhor sensibilidade diagnóstica e uma acurácia significativamente maior em relação à qPCR da hipoderme ( $p = 0,039$ ). Essa diferença na precisão contra os resultados de

quantificação pode ser explicada pelos diferentes pontos de corte usados para quantificação e detecção. Esses resultados complementam achados anteriores e reforçam a importância da coleta de amostras não invasivas para o diagnóstico de LTA (SUÁREZ et al., 2015).

O resultado obtido deve ser comparado também a estudos que afirmam que o envolvimento subcutâneo é uma das características histopatológicas mais importantes na LC (SHARQUIE et al., 2012; SHARQUIE; HAMEED; NOAIMI, 2016). Esse achado de tecido subcutâneo parece ser mais reativo e imunologicamente mediado. Ocorreram 4 perdas de subcutâneo no presente estudo, 3 no grupo LTA e 1 no grupo controle. As 4 lesões estavam localizadas em locais onde a biópsia teria que ser realizada de forma mais invasiva para conseguir chegar ao subcutâneo. Em 4 pacientes, as lesões estavam localizadas em locais (cabeça e dedos) de difícil acesso ao subcutâneo, e para tentar preservar a integridade dos pacientes a hipoderme não foi coletada. Os achados aqui elucidados reforçam a necessidade de implementar a biologia molecular na rotina laboratorial para o diagnóstico de LTA.

## **8. CONCLUSÃO**

### **8.1 Conclusão inicial**

Conclui-se que, para o diagnóstico molecular da LTA, técnicas de amostragem superficial podem recuperar uma quantidade confiável de parasitos em comparação às camadas mais profundas da pele. Isso fornece uma opção interessante para o diagnóstico de LTA, uma vez que as técnicas de amostragem não invasivas representam uma estratégia diagnóstica econômica. Futuros estudos sobre o papel da eliminação transepidérmica como mecanismo de defesa do hospedeiro ainda precisam ser elucidados.

### **8.2 Quantificação de protozoários na porção epidérmica, dérmica superior, dérmica inferior e no subcutâneo das bordas de úlceras cutâneas**

A epiderme de pacientes com LTA teve a maior média do número de parasitos e apresentou a terceira melhor acurácia diagnóstica neste estudo.

A derme superior de pacientes com LTA teve a segunda maior média do número de parasitos e apresentou a melhor acurácia diagnóstica neste estudo. A derme inferior obteve a terceira maior média do número de parasitos e apresentou a segunda melhor acurácia diagnóstica neste estudo.

O tecido subcutâneo de lesões de LTA apresentou a menor quantidade de parasitos e a acurácia diagnóstica foi a mais baixa.

### **8.3 Teste da acurácia diagnóstica da qPCR nas diferentes camadas da pele**

A melhor acurácia diagnóstica foi encontrada na porção dérmica da pele. A derme superior obteve a melhor acurácia seguida pela parte inferior. O tecido subcutâneo apresentou a menor acurácia diagnóstica dentre as 4 camadas.

#### **8.4 Discussão sobre a técnica de biópsia mais adequada (profundidade necessária) para o diagnóstico da LTA**

De acordo com todos os dados obtidos dentro desse estudo, foi comprovado que a biópsia pode ser realizada de forma menos invasiva, pois as camadas da pele mais superficiais possuem a maior quantidade de parasitos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abhishek D, Raghavendra R, Balachandran C. Salt split technique: a useful tool in the diagnosis of subepidermal bullous disorders. *Indian J Dermatol* 2010;55:334e6.

Alexandre JLA. Diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana utilizando a saliva coletada com swab. Recife. Dissertação. [Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde] – Instituto Oswaldo Cruz; 2015.

Barcarol LN, Malheiros M, Rodrigues M, Coser J. Aspectos clínicos e Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma Revisão da Literatura [Anais do XVI Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão; Universidade no desenvolvimento Regional; 04,05 e 06 de out Cruz Alta, 2011].

Boni SM, Oyafuso LK, Soler R de C, Lindoso JAL. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2017;59:38.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 2015;351:55-27.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Cavalier-Smith T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *Eur J Protistol* 2016;56:250-276

Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR -Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. *PLOS ONE* 2014;13:9:e88845

Cerutti PHP, LopesCG, Lopes Filho FG, Guedes VR. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão de literatura. *Revista de Patologia do Tocantins* 2017;4:55-59.

Coelho AMC. Padronização da técnica de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real para quantificação dos vírus quiméricos fa17d/den1, 2, 3, 4 candidatos a vacina tetravalente contra a dengue. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado profissional em tecnologia de imunobiológicos] – Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Curti MCM, Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Zanzarini PD, Venazzi EAS, Fernandes ACS, Teixeira JJV, Lonardon MVC. Aspectos epidemiológicos da

Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. Rev Ciênc Farm Básica Apl 2009;30:63-68.

Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. J Clin Epidemiol 2005;58:859-62.

Garbin CAS, Belila NM, Precinoti IB, Miyada S, Garbin AJI, Martins RJ. Abordagem multiprofissional no diagnóstico de leishmaniose: um relato de caso. Arch Health Invest 2017;6:359-362.

Galati EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Orgs.). Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz 2003;23-51.

Guimarães LH, Machado PRL, Lessa HA, Lessa M, Argemiro D'Oliveira Jr, Carvalho EM. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. Gaz. méd. Bahia 2005;75:66-74.

Ghorpade A. Histoid leprosy with mycobacterial keratinous bullets after possible transepidermal elimination of bacilli. Int J Dermatol 2013;52:1530-2.

Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, et al. Field validation of SYBR® Green- and TaqMan®-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in a Leishmania (V.) braziliensis-endemic area. J Clin Microbiol 2016;55:526-534.

Gomes CM, Paula NA, Moraes OO, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RNR. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis. An Bras Dermatol 2014;89:701-709.

Gomes MG. Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, swab nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise. Brasília. Tese [Doutorado em Ciências Médicas] – Universidade de Brasília; 2014.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop 2003;36:71-80.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:7276-7280.

Jacobina RR, Gelman EA. Juliano Moreira e a Gazeta Medica da Bahia. Hist cienc saude-Manguinhos 2008;15:1077-1097.

Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Arevalo J. Real-time PCR assay for detection and quantification of Leishmania (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. J Clin Microbiol 2013;5:1826-33.

Karram S, Loya A, Hamam H, Habib RH, Khalifeh I. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: a multiregional study. *J Cutan Pathol* 2012;39:406-12.

Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol* 2017;8:108.

Kubista M1, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.

Lima EB, Porto C, Motta JCO, Sampaio RNR. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol* 2007;82:111-24.

Lugassy J, Itin P, Ishida-Yamamoto A, Holland K, Huson S, Geiger D, et al. Naegeli-Franceschetti-Jadassohn syndrome and dermatopathia pigmentosa reticularis: two allelic ectodermal dysplasias caused by dominant mutations in KRT14. *Am J Hum Genet* 2006;79:724-30.

Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of Leishmania Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? *J Infect Dis* 2004;189:1018-23.

Miranda-Verastegui C, Llanos-Cuentas A, Arévalo I, Ward BJ, Matlashewski G. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2005;40:1395-403.

Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:309-22.

Momeni Boroujeni A, Aminjavaheri M, Moshtaghian B, Momeni A, Momeni AZ. Reevaluating leishmanin skin test as a marker for immunity against cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 2013;52:827-30.

Negrão GN, Ferreira MEMC. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. *Revista Percurso* 2014;6:147-168.

Neuvians TP, Gashaw I, Sauer CG, von Ostau C, Kliesch S, Bergmann M, Hhrker A, Grobholz R. Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis. *J Biotechnol* 2005;117:163-71.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2012;5:15.

Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally

infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:593-595.

Pelissari DM, Cechinel MP, Sousa-Gomes ML, Júnior FEFL. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil *Epidemiol Serv Saúde* 2011;20:107-110.

Rangel EF, Lainson R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomia do Brasil*. Fiocruz 2003;291-309.

Sadeghian G, Ziaei H, Bidabadi LS, Nilforoushzadeh MA. Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol* 2013;58:239.

Sanches LDC, Martini CC de, Nakamura AA, Santiago MEB, Dolabela de Lima B, Lima VMF de. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016;25:465-9.

Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med Trop* 2013;55:393-399.

Sharquie KE, Hameed AF. Panniculitis is an important feature of cutaneous leishmaniasis pathology. *Case Rep Dermatol Med* 2012;6:12434.

Sharquie KE, Hameed AF, Noaimi AA. Panniculitis is a common unrecognized histopathological feature of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Pathol Microbiol* 2016; 59:16-9.

Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci* 2011;2:21-25.

Silva JG, Silva TM, Peloso EF, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Ariosa MC, Silva PM, Marques MJ. Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:257-9.

Silva VM. Estudo de *Rhipicephalus sanguineus* (acari: ixodidae) como potencial vetor de leishmaniose visceral canina no distrito federal, Brasil. Brasília. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] – Universidade de Brasília; 2012.

Suárez M, Valencia BM, Jara M, Alba M, Boggild AK, Dujardin J-C, et al. Quantification of *Leishmania (Viannia) Kinetoplast DNA* in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003936.



Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2009;13:47-52.

Vale ECS, Furtado T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *An Bras Dermatol* 2005;80:421-8.

Viana AG, Mayrink W, Fraga CAC, Silva LM, DPLB, Bonan PRF et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *An Bras Dermatol* 2013;88:32-40.

Yamamoto T, Nishibu A, Eishi Y. Transepidermal elimination of sarcoidal granuloma in the lesional skin of psoriasiform sarcoidosis. *J Dermatol* 2017;44:100-1.

Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbel Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1409-15.

## ANEXO 1

Section & Topic	No	Item	Reported on page #
<b>TITLE OR ABSTRACT</b>			
	<b>1</b>	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	✓
<b>ABSTRACT</b>			
	<b>2</b>	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	✓
<b>INTRODUCTION</b>			
	<b>3</b>	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	✓
	<b>4</b>	Study objectives and hypotheses	✓
<b>METHODS</b>			
<i>Study design</i>	<b>5</b>	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	✓
<i>Participants</i>	<b>6</b>	Eligibility criteria	✓
	<b>7</b>	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	✓
	<b>8</b>	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	✓
	<b>9</b>	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	✓
<i>Test methods</i>	<b>10a</b>	Index test, in sufficient detail to allow replication	✓
	<b>10b</b>	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	✓
	<b>11</b>	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	✓
	<b>12a</b>	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	<b>12b</b>	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	<b>13a</b>	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	✓
	<b>13b</b>	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	✓
<i>Analysis</i>	<b>14</b>	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	✓
	<b>15</b>	How indeterminate index test or reference standard results were handled	✓
	<b>16</b>	How missing data on the index test and reference standard were handled	✓
	<b>17</b>	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	<b>18</b>	Intended sample size and how it was determined	✓
<b>RESULTS</b>			
<i>Participants</i>	<b>19</b>	Flow of participants, using a diagram	✓
	<b>20</b>	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	✓
	<b>21a</b>	Distribution of severity of disease in those with the target condition	✓
	<b>21b</b>	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	✓

	<b>22</b>	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	✓
<i>Test results</i>	<b>23</b>	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	✓
	<b>24</b>	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	✓
	<b>25</b>	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	✓
<b>DISCUSSION</b>			
	<b>26</b>	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	✓
	<b>27</b>	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	✓
<b>OTHER INFORMATION</b>			
	<b>28</b>	Registration number and name of registry	✓
	<b>29</b>	Where the full study protocol can be accessed	✓
	<b>30</b>	Sources of funding and other support; role of funders	✓

## STARD 2015

### AIM

STARD stands for “Standards for Reporting Diagnostic accuracy studies”. This list of items was developed to contribute to the completeness and transparency of reporting of diagnostic accuracy studies. Authors can use the list to write informative study reports. Editors and peer-reviewers can use it to evaluate whether the information has been included in manuscripts submitted for publication.

### Explanation

A **diagnostic accuracy study** evaluates the ability of one or more medical tests to correctly classify study participants as having a **target condition**. This can be a disease, a disease stage, response or benefit from therapy, or an event or condition in the future. A medical test can be an imaging procedure, a laboratory test, elements from history and physical examination, a combination of these, or any other method for collecting information about the current health status of a patient.

The test whose accuracy is evaluated is called **index test**. A study can evaluate the accuracy of one or more index tests. Evaluating the ability of a medical test to correctly classify patients is typically done by comparing the distribution of the index test results with those of the **reference standard**. The reference standard is the best available method for establishing the presence or absence of the target condition. An accuracy study can rely on one or more reference standards.

If test results are categorized as either positive or negative, the cross tabulation of the index test results against those of the reference standard can be used to estimate the **sensitivity** of the index test (the proportion of participants *with* the target condition who have a positive index test), and its **specificity** (the proportion *without* the target condition who have a negative index test). From this cross tabulation (sometimes referred to as the contingency or “2x2” table), several other accuracy statistics can be estimated, such as the positive and negative **predictive values** of the test. Confidence intervals

around estimates of accuracy can then be calculated to quantify the statistical **precision** of the measurements.

If the index test results can take more than two values, categorization of test results as positive or negative requires a **test positivity cut-off**. When multiple such cut-offs can be defined, authors can report a receiver operating characteristic (ROC) curve which graphically represents the combination of sensitivity and specificity for each possible test positivity cut-off. The **area under the ROC curve** informs in a single numerical value about the overall diagnostic accuracy of the index test.

The **intended use** of a medical test can be diagnosis, screening, staging, monitoring, surveillance, prediction or prognosis. The **clinical role** of a test explains its position relative to existing tests in the clinical pathway. A replacement test, for example, replaces an existing test. A triage test is used before an existing test; an add-on test is used after an existing test.

Besides diagnostic accuracy, several other outcomes and statistics may be relevant in the evaluation of medical tests. Medical tests can also be used to classify patients for purposes other than diagnosis, such as staging or prognosis. The STARD list was not explicitly developed for these other outcomes, statistics, and study types, although most STARD items would still apply.

#### DEVELOPMENT

This STARD list was released in 2015. The 30 items were identified by an international expert group of methodologists, researchers, and editors. The guiding principle in the development of STARD was to select items that, when reported, would help readers to judge the potential for bias in the study, to appraise the applicability of the study findings and the validity of conclusions and recommendations. The list represents an update of the first version, which was published in 2003.

More information can be found on <http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard>.

## ANEXO 2

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Quantificação do kDNA de Leishmania Viannia por qPCR em diferentes profundidades de lesões cutâneas

**Pesquisador:** Laís Sevilha dos Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 56709316.3.0000.5558

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário de Brasília - HUB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.635.976

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa que pretende utilizar o PCR em tempo real (qPCR) em amostras das camadas da pele (epiderme, derme e na hipoderme) de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) confirmado, com a intenção de quantificar o parasito em profundidade na pele. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é caracterizada por uma doença infecciosa responsável por causar lesões cutâneas e mucosas. O diagnóstico é realizado por exames parasitológicos e imunológicos, porém essas técnicas apresentam limitações com relação à sensibilidade e especificidade respectivamente. Com a necessidade de tornar o diagnóstico de LTA mais eficaz, as técnicas de biologia molecular começaram a ser utilizadas em estudos e se mostraram muito promissoras. Também influenciam na acurácia dos resultados, a forma e o local onde a coleta é realizada nas lesões.

Os pacientes serão recrutados no Hospital Universitário de Brasília – HUB, onde será realizada a biópsia. As amostras serão processadas no Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UnB). A separação das camadas da pele será feita pela técnica de salt-split skin e a extração do DNA mitocondrial de cinetoplastos (kDNA) pelo Kit comercial NucleoSpin® Tissue. As reações de PCR em tempo real serão realizadas com iniciadores específicos para as sequências do kDNA da Leishmania do subgênero Viannia, MP1L e MP3H,

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

Continuação do Parecer: 1.635.976

resultando em um produto amplificado de 70 pares de base (pb). Serão incluídas, consecutivamente, amostras de pele de pacientes com diagnóstico de LTA e que realizaram previamente os exames diagnósticos para inclusão. Os critérios diagnósticos de LTA seguirão especificações previamente descritas por Gomes e colaboradores em 2014, por meio da definição do padrão composto de referência (diagnóstico clínico, sorológico, parasitológico e molecular). Serão excluídos pacientes menores de 18 anos, pertencentes a comunidades indígenas ou que não assinem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), bem como pacientes com suspeitas de outras doenças que simulem Leishmaniose Tegumentar Americana, como micoses profundas e tuberculose. O estudo prevê amostra de 40 participantes.

A biópsia incisional será realizada após assepsia, antisepsia e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O local escolhido para obtenção da amostra será a periferia da lesão de LTA. Este fragmento será coletado por biópsia incisional de 0,5x0,5cm. Esta coleta já é realizada como rotina para o diagnóstico da LTA no serviço de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília-HUB, portanto, o paciente não realizará biópsia adicional para este estudo, apenas as camadas da pele serão divididas e o exame será feito em separado por cada camada dividida.

Dessa forma, os pesquisadores esperam conseguir descrever a melhor profundidade da lesão para se realizar a coleta das amastigotas de Leishmania, melhorando assim tanto o diagnóstico quanto a verificação da eficácia do tratamento.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo geral

Realizar uma quantificação relativa de protozoários em lesões de LTA nas diferentes camadas da pele.

##### Objetivos específicos:

1. Quantificação relativa de protozoários na porção epidérmica das bordas de úlceras cutâneas.
2. Quantificação relativa de protozoários na porção dérmica de úlceras cutâneas.
3. Quantificação relativa de protozoários no tecido subcutâneo de lesões de LTA.
4. Relacionar a quantificação do parasito com as características clínicas da LTA como gravidade da doença e resposta ao tratamento.
5. Desenvolver comentários sobre a técnica de biópsia mais adequada (profundidade necessária) para o diagnóstico da LTA.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O risco à participação do estudo consiste nos problemas inerentes ao manuseio de

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
UF: DF Município: BRASILIA  
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

Continuação do Parecer: 1.635.976

amostras laboratoriais como perdas, trocas e inviabilização por erros de processamento, uma vez que o fragmento já coletado para exame de reação em cadeia da polimerase será usado. A biópsia já coletada para este exame será apenas dividida e o mesmo exame será realizado em camadas separadas da pele.

Benefícios: Espera-se conseguir descrever a melhor profundidade da lesão para se realizar a coleta das amastigotas de Leishmania, melhorando assim tanto o diagnóstico quanto a verificação da eficácia do tratamento.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma proposta de desenvolvimento de pesquisa como pré-requisito para obtenção de título de mestrado acadêmico junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB, tendo como orientador a Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. O projeto está bem fundamentado, apresenta o cronograma de atividades factível, previsão orçamentária de R\$10.203,20 sem especificação de fonte de recurso.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos estão adequados.

**Recomendações:**

Sugiro que a pesquisadora especifique a fonte de recursos de financiamento da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto de pesquisa está adequado e apresenta relevância. No entanto, sugiro que a pesquisadora especifique a fonte de recursos de financiamento da pesquisa.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto apreciado na Reunião Extraordinária do CEP-FM-UnB. Após apresentação do parecer do Relator, aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado por unanimidade.

Recomenda-se à pesquisadora apresentar fontes de financiamento do seu projeto.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_690790.pdf	03/06/2016 13:55:21		Aceito

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 1.635.976

Outros	TermodeConcordancia.pdf	03/06/2016 13:52:43	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/06/2016 13:52:04	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	Cartadeencaminhamento.pdf	20/05/2016 00:06:06	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	Termoderesponsabilidade.pdf	10/05/2016 17:42:04	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	CurriculoLattesRaimundaNonataRibeiro Sampaio.pdf	10/05/2016 17:41:14	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	CurriculosLattesLaisSevilhadossantos.pdf	10/05/2016 17:36:49	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	CurriculoLattesCiroMartinsGomes.pdf	10/05/2016 17:31:29	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoQuantificacaoVS.pdf	09/05/2016 20:36:02	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termodeciencia.pdf	09/05/2016 19:42:23	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	09/05/2016 19:35:26	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	25/04/2016 20:04:30	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	25/04/2016 20:04:20	Lais Sevilha dos Santos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 14 de Julho de 2016

Assinado por:

Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto  
(Coordenador)

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br



## ANEXO 3

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÊDICAS- HUB LABORATÓRIO DE DERMATOMICOLOGIA

#### FICHA CLÍNICA qPCR

##### 1. IDENTIFICAÇÃO

Número prontuário: \_\_\_\_\_ . Telefone: \_\_\_\_\_ .

Nome: \_\_\_\_\_ .

Endereço: \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_ .

DN: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ . Idade \_\_\_\_\_ anos. Sexo: ( ) M ( ) F.

Escolaridade: \_\_\_\_\_ . Naturalidade: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

Profissão: \_\_\_\_\_ .

##### 2. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA

Procedência: \_\_\_\_\_ .

Área: urbana ( ); rural ( ); periurbana ( ).

Local do provável contágio: \_\_\_\_\_ .

a. Teve Leishmaniose anteriormente? Sim ( ) Não ( )

b. Se sim, foi tratado? Sim ( ) Não ( )

c. Se sim, há quantos meses acabou o tratamento? \_\_\_\_\_ .

d. Droga utilizada? \_\_\_\_\_ .

e. Dose? \_\_\_\_\_ .

f. Efeitos adversos? Sim ( ) Não ( )

g. Quais efeitos adversos foram observados? \_\_\_\_\_ .

##### 3. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PREGRESSOS

- Diabetes Mellitus ( );

- Hipertensão Arterial ( );

- Alergias ( );

- Cardiopatia ( );

- Nefropatia ( );

- Pneumopatias ( );

- HIV/ AIDS ( ); Outros \_\_\_\_\_.

Outras imunodeficiências: \_\_\_\_\_.

Uso de imunossupressores: \_\_\_\_\_.

#### 4. HISTÓRIA CLÍNICA E EXAME FÍSICO

Número total de lesões cutâneas: \_\_\_\_\_.

Local das lesões (descreva com detalhes as lesões):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Aspecto:

- a. úlcera ( );
- b. pápula ( );
- c. verrucosa ( );
- d. esporotricóide ( );
- e. disseminada- 10 a mais lesões de pele ( );
- f. recidiva cútis ( );
- g. outros ( ). Especificar qual outro tipo: \_\_\_\_\_.

Tempo de início da lesão: \_\_\_\_\_.

#### 5. HIPÓTESE DIAGNÓSTICA

- LTA cutânea localizada ( );
- LTA cutânea disseminada ( );
- Paracoccidiodomicose ( );
- Cromoblastomicose ( );
- Outra ( ). Especificar qual: \_\_\_\_\_.
- LTA cutânea recidiva cútis ( );
- LTA cutânea difusa ( );
- Esporotricose ( );
- Tuberculose ( );

#### 6. EXAMES LABORATORIAIS

a. Sorologias:

EXAME	RESULTADO	DATA DD/MM/AA	EXAME	RESULTADO	DATA DD/MM/AA
HIV		___/___/___	Chagas		___/___/___

**b. Exames específicos para LTA:**

EXAME	RESULTADO	DATA DD/MM/AA	EXAME	RESULTADO	DATA DD/MM/AA
IDRM		___/___/___	IFI para LTA		___/___/___
Pesquisa de amastigota		___/___/___	Cultura		___/___/___

c. Resultados de exames para outras doenças que não LTA: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

d. Histopatológico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

e. qPCR: \_\_\_\_\_.

f. NanoVue: \_\_\_\_\_.

**7. TRATAMENTO**

Droga: \_\_\_\_\_.

Peso: \_\_\_\_\_. Dose: \_\_\_\_\_. Dose por Kg: \_\_\_\_\_.

Duração do tratamento: \_\_\_\_\_.

**8. RESPOSTA AO TRATAMENTO DAS LESÕES CUTÂNEAS**

Aspecto lesão	Fim tratamento	D 30	D 90	D 180
Ativa				
Em cicatrização				
Cicatrizada				

**9. NECESSIDADE DE NOVOS TRATAMENTOS**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Motivo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.



## ANEXO 4

### RESPONSE TO REVIEWERS' COMMENTS

Dear editor of Clinical Microbiology and Infection and reviewers,

First of all thank you very much for the fast and detailed review of the present manuscript. We are very happy that no methodological issues were pointed. We are also glad for the compliments we received regarding our rigorous methodological standards. Once most of the suggestions were related to text correction and clarification we agreed with all the suggestions and we also agree that those comments helped to improve our study. Our corrections were also submitted to a professional, native-speaker English review. Please, find bellow detailed responses to the referred comments. We also attached two manuscript versions, one with visible modifications and another one for early view if the article is completely accepted.

Sincerely

#### **REVIEWER: 1**

##### **Comments to the Author**

The current study “Accuracy and quantification of Leishmania kDNA using qPCR in different skin layers of patients with American Tegumentary Leishmaniasis” by Sevilha-Santos et al., reports in which skin layer (collected from skin biopsies of ATL lesions) a larger quantity of parasites could be obtained in order to increased qPCR accuracy for ATL diagnosis.

This manuscript contributed with novel data to better understand ATL pathogenesis and host defense, as well with important technical information to improve performance of molecular biology techniques, which justified my recommendation for publication in Clinical Microbiology and Infection.

Study design was correctly applied following STARD 2015 recommendations. Authors were rigorous in data collection and analysis, with a meticulous standardization of the index test and further validation and interpretation of the results.

With your respect, following I suggest some specific comments that may be useful to improve the manuscript and some details that could arise from journal's audience:

##### **➤ Introduction.**

- First paragraph – Page 5, lines 15 to 20. Please avoid subjective terms as “good”, “unsatisfactory”, “variable”, “low”. Following the used references, please describe objective values in order for better comparison and visualization of diagnostic test performances.  
As indicated, we replaced the term unsatisfactory sensitivity by “ a maximum 80% sensitivity in ideal conditions” as indicated.
- **Hypothesis is stated in the discussion section (STARD 2015, item 4 – Introduction).**

As indicated, we have moved Hypothesis statement to the final part of the introduction along with main objectives. We also included a reference that supports this information.

➤ **Methods.**

- **Study was conducted in a specific outpatient clinic? Infectious diseases, dermatology, others?**

The study was conducted in an ambulatory specialized in the diagnosis and treatment of American tegumentary leishmaniasis. This ambulatory is a part of the Dermatology division of Medical Clinics of the Faculty of Medicine, University Hospital of Brasília, Universidade de Brasília, Brazil. This is now better explained in the methods section.

- **Who performed the patients' recruitment and enrollment? One or more health-care professionals? They have experience in the field (regarding the clinical difficulties of ATL diagnosis).**

The recruitment was performed always by the same board-certified dermatologist unaware of the final diagnosis of eligible patients, but capable detecting a ATL suspicious case. As indicated, this is now better explained in the methods section.

- **Some readers could be concern about eligibility criteria: “clinical presentation compatible with ATL”. Unspecific panniculitis or some others atypical forms of ATL were also included?**

Dear reviewer #1, thank you for the present comment. The term panniculitis generated some confusion to most reviewers. In reality, this term was used because previous references that studied histopathological exams stated that “panniculitis” represented important findings in ATL histopathology. However, when citing panniculitis those very same authors were referring to the subcutaneous involvement in ATL. This is represented by unspecific granuloma, unspecific infiltrate and even parasites, an exclusively histopathological classification.

We agree that, specially for dermatologists, the term “panniculitis” can resemble a very specific type of disease that is usually represented by conditions that are panniculitis by essence and that can evolve for ulceration.

In order to avoid this real source of confusion we have replaced the term “panniculitis” by subcutaneous involvement. We believe that these changes will make it more clear that we are studying classical subcutaneous alterations of ATL.

It is also important to state that our eligibility criteria were applied by a board-certificated dermatologist as clarified above. Although ATL can present a variety of clinical presentations, very atypical cases of ATL would not be sent to this ATL specialized ambulatory and also this specialized evaluation would easily identify a classical unspecific panniculitis that usually occurs with more spreaded lesions differently from ATL. This is now better clarified in the text.

- **Exclusion criteria. Could any immunosuppression factor (such as HIV infection, chronic use of corticosteroids, etc.) affect the index test performance? Please discuss.**

Dear reviewer, thank you for this important remark. In fact severe cases of immunosuppression would enhance sensitivity of the index test. This effect can be explained by the fact that an ineffective immunological fighting against *Leishmania*

would result in a greater quantity of parasites within the lesion. In the present study this was an exclusion criteria as it can be seen in our research protocol. However it was cited within special populations due to word-limit issue. This is now clarified in the exclusion criteria paragraph in order to clarify this important remark.

- **As state in introduction, “adequate collection technique is essential to increase accuracy”. Please provide the expertise and the number of researched who performed the incisional biopsy.**

The collection of incisional biopsy was performed immediately after inclusion criteria application. Similar to recruitment it was also always made by the same board certified dermatologist. This is a classical method in our hospital once the ATL ambulatory is a part of a big and specialized dermatology service in a tertiary hospital. This is now better clarified in the text.

➤ **Results.**

- **There was any adverse effect during samples collection (incisional biopsy)?**

No significant adverse effects were recorded during sample collection. This was already expected once incisional biopsy was performed in already ulcerated or verrucous areas. In this case the damage to surrounding tissues is usually negligible. The sterile nature of the procedure avoided any secondary infection related to biopsy. This is now cited in the text, in the results section.

➤ **Discussion.**

- **There is a very interesting item discussed in page 14, lines 7 to 10 related to false positive result and the fact that inactive parasites’ molecules could be found even after patient was treated. Considering authors reference standard (“at least one parasitological or molecular test was positive”), please briefly discuss how you decided the allocation of this patient.**

Thank you for this interesting remark. It is well documented in the literature that the cure of American tegumentary leishmaniasis is related to the clinical aspect of the lesion. Some references have described even cultivable live parasites in patients affected by the disease years after clinical cure. {Mendonca:2004jt} In the present case, the parasitological exams were all negative as a criteria for the allocation in the control group. This finding of a negative parasitology together with no specific infiltrate, rules out, with a good degree of confidence, the diagnosis of active cutaneous leishmaniasis.

Once qPCR techniques are considerably more sensitive than parasitological exams and than conventional PCR, our index test results may have found low quantities of parasite DNA in the lesion. Those structures were not detectable by parasitological exams.

We agree that with the absence of a gold standard for the diagnosis of leishmaniasis, the definite diagnosis of the disease has a considerable subjective characteristic. In the present case, the low sensitivity of parasitological exams, the presence of incompatible inflammatory infiltrate and the healing of the lesion without specific treatment made us classify the patient as a control. So we considered that the presence of *Leishmania* kDNA by qPCR has a similar significance than the findings of parasites in healed lesions. They don’t mean always, disease activation. However, in practice we can allways expect the possibility of false negative and false positive

results for reference standards and for index tests. This is very interesting and it is better clarified in the text.

➤ **Tables and Figures.**

- **Please check spelling in Figure 3 (box 4).**

**Additionally, despite English been well written and completely understandable, I may recommend a final revision by a native-speaker.** All the manuscript, figures and tables were subject to an additional, detailed native-speaker editing prior to resubmission.

**Finally, I would to congrats the authors for the outstanding job. Certainly this paper will encourage many authors in the field for further studies and applicability of the authors' findings.**

Thank you very much.

**REVIEWER: 2:**

**Comments to the Author**

**The manuscript is really interesting and important to the area. But has some points that need to be better explained or described.**

**1. The authors always talks about panniculitis in ATL, but the real relationship with the results of the manuscript wasn't clear. Did the studied patients have panniculitis?**

Dear reviewer #2, thank you for the present comment. The term panniculitis generated some confusion and is in line with reviewer #1 comments. This term, one of the motivations of this research, as showed in our introduction, was cited by 2 articles published by Sharquie et al. 2012 and 2016. However, when referring to ``panniculitis``, those authors were considering the subcutaneous involvement in ATL. They were referring as ``panniculitis`` the unspecific inflammation of subcutaneous tissue in ATL. This is represented by unspecific granuloma, unspecific infiltrate and sometimes by parasites in the inflammatory infiltrate.

We agree that, especially for dermatologists, the term ``panniculitis`` can resemble a very specific type of disease that is usually represented by conditions that are ‘panniculitis’ by essence and that can evolute for ulceration.

To avoid this real source of confusion we have replaced the term ``panniculitis`` by ``subcutaneous involvement``. We believe that these changes will make it more clear that we are studying classical subcutaneous alterations of ATL.

Although ATL can present a variety of clinical presentations, the presently studied patients presented only subcutaneous involvement or infiltration related to typical ATL and its differential diagnosis (ulcerated lesions and verrucous lesions). This was warranted by the inclusion process made by board-certificated dermatologists.

**2. In the Methods: Composite reference standard: The second paragraph, about excluded patients, is confused. Rewrite.**

We agree that this indicated part could generate confusion. In fact, this exclusion criteria is not related to the composite reference standard application. It is referred to inclusion criteria. This



part was moved for the recruitment section in order to improve article didactics. The rationale for exclusion criteria is better explained in the text.

**3. Sample collection: Reference for the salt-split skin technique?**

As requested, a reference for the above-mentioned technique was included. {De:2010es}

**4. Correct *Leishmania spp.*: Sometimes in the manuscript the spp. is also in italic.**

The correction was performed as requested.

**5. Sample size should be at the beginning of the methods.**

As requested, the sample size calculation methods were moved to the beginning of the methods section.

**6. Discussion. At the first phrase: Better talk about leishmaniasis (plural).**

The correction was performed as requested.

**7. Discussion. What is the real relationship between panniculitis and the results of the manuscript? It is not clear how the results of the manuscript can be compared with others manuscripts that stated that panniculitis is one of the most important histopathological features in ATL.**

As commented in question 1, the term panniculitis was used by the authors who described that subcutaneous involvement is an important feature of classical tegumentary leishmaniasis. We believed that the substitution of the term panniculitis by subcutaneous involvement will clarify our comments. The same authors described that the subcutaneous involvement was one of the most common findings in tegumentary leishmaniasis histopathology but some samples techniques such as punch biopsy and scraping have a limited access to the subcutaneous tissue. In this study we showed that the subcutaneous alterations found by Sharquie et al. 2012 and 2016 were more related to the adjacent spreading of the inflammatory infiltrate than due to parasite dissemination. This is now better clarified in the text with the above-mentioned alterations.

**8. At the third paragraph of the discussion, authors say about the significant quantity of *Leishmania spp.* kDNA in the epidermis, but at the results say that it wasn't significant.**

We agree that the term significant can generate some confusion. In the results section we were referring to a comparative statistical and clinical significance. This lack of significance was related only to the difference between groups. However, although comparison was not significantly different in this case there is still a considerable number of leishmania parasites in the epidermis (a mean  $781.7 \times 10^6$  parasites per tissue micrograms). We replaced the term significant by the term considerable in the discussion section in order to avoid this relevant source of confusion.

**9. The fourth paragraph is really confused. The studied ATL population had significant predominance of *L. braziliensis* or only *L. braziliensis*? Are you talking about the patients of the study? Rewrite it better.**

We agree that this paragraph is confusing and it was reformulated.

**10. Can the authors say that the DNA of the patient previously treated is from inactive parasites? It is really false positive or a latent infection?**

Dear reviewer, thank you for this important remark. We agree that it is impossible to state if a positive index test in a control patient means primer dimerization or the presence of inactive

parasites. We believe that, in this specific case, considering the presently used composite reference standard, the term false positive can cover real false positive results and also false positive results related to inactive or fragmented parasites. This theory is now corroborated with evidences stating that the cure of ATL is a merely clinical consideration and that some authors could even cultivate parasites in long-time cured lesions. {Mendonca:2004jt}

### **REVIEWER: 3**

#### **Comments to the Author**

**In general the study is very relevant and well conducted. I only pointed out some revision points or suggestions for authors. Please see the attached file.**

#### **Keywords: Leishmaniasis is repeated**

Dear author, thank you for the detailed evaluation of our manuscript. We have now followed Mesh terms recommendations in which `Cutaneous Leishmaniasis` is named as `Leishmaniasis, Cutaneous`. Now, each different keyword is separated by ;. At the same time composite keywords are divided by commas.

#### **Page 4 line 7: than in biopsies**

The term was subjected to a professional, native-speaker review.

#### **Page 4 line 29 and 33: 106 should be replaced for 106**

The present issues were corrected as requested.

#### **Page 6 line 31 and 38: “ATL positive patients sounds better than “Patients were classified as having ATL...”**

This modification was performed as requested.

#### **Page 6 line 51: Missing comma between age and were**

This paragraph has been formulated as requested by reviewer #2 and this incorrection was solved.

#### **Page 6: This title could be clarified “Composite reference standard”**

The indicated subtitle was reformulated and it now indicates that patients were classified according to a composite reference standard once a gold standard for American tegumentary leishmaniasis is not available.

#### **Page line 11: Instead of “length of disease” disease duration is not a better term?**

The indicated term was replaced as requested.

#### **Page 11 line 22: “The *L. Viannia* subgenus was found in all patients (N = 13) in whom the PCR-RFLP was positive.” This number does not represent the total of patients. Is should be explained.**

Dear reviewer, thank you for this important remark. In fact *Leishmania* species classification can be a controversial topic. Some authors even consider that some species like *Leishmania braziliensis* and *Leishmania peruviana* should not be classified as different species. Previous references state that the presently used qPCR and melting curve analysis is capable of differentiating all species of leishmania. {PitaPereira:2012bh} However, we decided to be

cautious in this topic once our qPCR works with a very small quantity of *Leishmania* DNA in skin samples. So we questioned ourselves if regional genetic and intraspecies variations could jeopardize melting curve analysis classification.

Considering the above-mentioned concept we decided to reprocess our DNA samples aiming a wider genetic target, the known ITS-1 primer pairs. {MedeirosSilva:2015gg} As this genetic target is considerably bigger than kDNA target in qPCR we expect that the ITS PCR will have a lower sensitivity. This explains why only 13 of the positive patients were also positive in the ITS conventional PCR.

As requested, this is now better clarified in the text. We cited that all qPCR were compatible for *L. braziliensis* and that the ITS PCR corroborated this findings. In the discussion section we reinforce this topic by ensuring that only *L. braziliensis* and *L. amazonensis* are found in this region. We believe that this discussion gives a reliable and responsible view about species identification. It is also important to reinforce that we are citing a qPCR method published and that differentiated all *Leishmania* species. However, the association to a better genetic evidence and to an epidemiological evidence make our conclusions more reliable.

**Page 27: The image and scheme is repeated.**

Dear reviewer, the last image is the optional striking image asked by journal editors. This has several similarities with figure one but it doesn't make part of the manuscript. This is only for editorial and cover purposes. Unfortunately the submission system doesn't make it clear for reviewers.

**Page 10 line 33: The name of the university should be revised.**

As requested we substitute the hospital name as recommended by the proper institution.

**Discussion: I would reinforce in the discussion Suarez et al 2015 findings that together with this work bring a better and less invasive collection sampling method.**

This complementary characteristic between the present study and the study from Suárez et al 2015 was reinforced in the second paragraph of discussion as requested.

**Table 2: Since there was no statistical difference among parasite loads form tissues portions, a graphic representation with interquartile range or all point would give a better idea of values distribution, easier than a table.**

Dear reviewer #3, we also agree that the parasite loads is less informative than an interquartile range in graphical data. However, we have reached the maximum number of tables/figures of five. As the number of true positive, false negative, false positive and true negative patients is essential for possible future meta-analysis we decided to include parasite load as illustrative data. The mean and median values also give an idea of central distribution, and the statistical tests show the similarity between them in a 95% probability. We believe that this comparison between parasite load and sensitivity is very important once although numerical data was not statistically different, accuracy values (that were measured by different cut-offs) were different in some skin layers. This comparison gives the notion of clinical relevance according to the skin layer evaluated for diagnostic access.

Once the quantification limit was considerably higher than detection limit, we believe that the parasite load is more informative than important for analysis. Also once fewer patients were quantified than were analyzed for accuracy, box-plot graphics for example will have a limited capacity of information related to our main goal.

**About controls, I only could understand that control group comprised a set of other pathologies different from Leishmaniasis in the results section. It would be better to clarify this aspect of the study earlier in methods.**

We clarified that the control group was represented by set of other pathologies different from ATL but with considerable clinical similarity in the methods section as requested.

## ANEXO 5

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed  Search

US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

Advanced Help

Format: Abstract Send to

*Clin Microbiol Infect.* 2018 May 3. pii: S1198-743X(18)30365-3. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.025. [Epub ahead of print]

### Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis.

Sevilha-Santos L<sup>1</sup>, Agenor C MDSJ<sup>1</sup>, Viviane Medeiros S<sup>1</sup>, Jaqueline Osiro B<sup>1</sup>, Eduardo Freitas DS<sup>2</sup>, Larissa Freire S<sup>3</sup>, Arthur Youssif Mota A<sup>4</sup>, Natália Aparecida P<sup>5</sup>, Raimunda Nonata RS<sup>6</sup>, Beatriz DL<sup>7</sup>, Ciro Martins G<sup>8</sup>.

**Author information**

**Abstract**

**OBJECTIVES:** Superficial swab sampling of American tegumentary leishmaniasis (ATL) lesions shows higher amounts of *Leishmania* than those from biopsy. Subcutaneous involvement is also important in ATL, but parasite quantification according to lesion depth has not been evaluated. We aim to present the best depth at which sampling should be performed for molecular exams of ATL.

**METHODS:** Patients with a clinical presentation compatible with ATL were allocated to ATL and control groups. Qualitative and quantitative qPCR assays were performed using SYBR Green and primers amplifying the kDNA minicircle of *Leishmania* spp. in different skin layers, including the epidermis, the superior dermis, the inferior dermis and the hypodermis.

**RESULTS:** Fifty-nine patients were included in this study, including 40 who had been diagnosed with ATL and 19 controls. The number of parasites was greater in samples of the epidermis and superior dermis (159.1 (range=4.0-781.7) and 75.4x10<sup>6</sup> (range=8.0-244.5) mean *Leishmania* parasite equivalents per µg of tissue DNA, respectively) than those in samples of the inferior dermis and hypodermis (54.6 (range=8.0-256.6) and 16.8x10<sup>6</sup> (range=8.0-24.1) mean *Leishmania* parasite equivalents per µg of tissue DNA, respectively). The best diagnostic accuracy was achieved in the superior dermis (77.9%) and was significantly greater than that in the hypodermis (63.3%; p=0.039).

**CONCLUSIONS:** We conclude that superficial sampling can retrieve a greater quantity of parasites. Future studies of the role of transepidermal elimination as a mechanism of host defence in ATL must be performed since there is a considerable quantity of *Leishmania* kDNA in the epidermis.

**Full text links**

ELSEVIER  
FULL-TEXT ARTICLE

**Save items**

★ Add to Favorites

**Similar articles**

Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Us [*J Clin Microbiol.* 2017]

Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishman* [*J Clin Microbiol.* 2013]

The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate [*Parasit Vectors.* 2017]

Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) togeth [*Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2...]










**Review** [Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*]. [*Parassitologia.* 2004]

See reviews...  
See all...

## ANEXO 6

08/05/2018 Frontiers | PD-L1 MAY MEDIATE T CELL EXHAUSTION IN A CASE OF EARLY DIFFUSE LEISHMANIASIS CAUSED BY LEISH...

# PD-L1 MAY MEDIATE T CELL EXHAUSTION IN A CASE OF EARLY DIFFUSE LEISHMANIASIS CAUSED BY LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS

 Daniel H. Barroso (<https://loop.frontiersin.org/people/469837/overview>)<sup>1, 2\*</sup>,  Sarah D. Falcão (<https://loop.frontiersin.org/people/352047/overview>)<sup>3, 4</sup>,  Jorgeth d. Motta (<https://loop.frontiersin.org/people/557004/overview>)<sup>5</sup>,  Laís S. dos Santos (<https://loop.frontiersin.org/people/556507/overview>)<sup>6</sup>,  Gustavo H. Takano (<https://loop.frontiersin.org/people/557491/overview>)<sup>7</sup>,  Ciro M. Gomes (<https://loop.frontiersin.org/people/538912/overview>)<sup>1, 4, 5</sup>,  Cecília B. Favali (<https://loop.frontiersin.org/people/321076/overview>)<sup>3, 4</sup>,  Beatriz D. de Lima<sup>3</sup> and  Raimunda N. Sampaio (<https://loop.frontiersin.org/people/556540/overview>)<sup>1, 2, 5, 6</sup>

<sup>1</sup>Medicine Faculty, University of Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brazil

<sup>3</sup>Biology Institute, University of Brasília, Brazil

<sup>4</sup>Faculty of Medicine, University of Brasília, Brazil

<sup>5</sup>Faculty of Medicine, University of Brasília, Brazil

<sup>6</sup>Faculty of Medicine, University of Brasília, Brazil

<sup>7</sup>Pathology Service, Hospital Universitário de Brasília, Brazil

**Introduction:** Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) is a rare disease form associated with *L. (L.) amazonensis* in South America. It represents the “anergic” pole of American Tegumentary Leishmaniasis and the explanation for its resistance to treatment remains elusive. We aimed to study some possible immunological mechanisms involved in the poor DCL treatment response by evaluating some cell surface molecules obtained from a patient with DCL by flow cytometry.

**Case presentation:** A 65-year-old DCL patient who initially failed to respond to the standard treatment for the disease showed vacuolated macrophages filled with amastigotes in lesion biopsy, and *L. (L.) amazonensis* was identified through ITS1PCR amplification. The Leishmania skin test and indirect immunofluorescence analysis revealed negative results. Peripheral blood from the patient was collected after a few months of treatment, when the patient presented with no lesion. Peripheral blood mononuclear cells were analyzed *ex vivo* and *in vitro* after 48 h of stimulation with soluble *L. (L.) amazonensis* antigen (SLA). Cell death, surface molecules and intracellular molecules, such as IFN- $\gamma$  and granzyme B, were analyzed in the cells using flow cytometry. Analysis of the surface markers showed increased expression of the inhibitory molecule PD-L1 in the monocytes restimulated with SLA (approximately 65%), whereas the negative controls were 35% positive for PD-L1. Conversely, compared with the negative controls, we observed a decrease in CD4+IFN- $\gamma$ + T cells (8.32% versus 1.7%) and CD8+IFN- $\gamma$ + T cells (14% versus 1%). We also observed a relevant decrease in the granzyme B levels in the CD8+ T cells, from 31% in the negative controls to 5% after SLA restimulation.

**Conclusion:** The dysfunctional activation of PD-L1 inhibitory pathway after Leishmania antigen stimulation and reduced levels of IFN- $\gamma$  and granzyme B producing-cells could be closely related to unresponsiveness to standard drug treatment of the DCL patient.

**Keywords:** diffuse cutaneous leishmaniasis, PD-L1, Leishmania *L. amazonensis*, Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), granzyme B, t cell exhaustion

**Received:** 01 Feb 2018; **Accepted:** 24 Apr 2018

Edited by:

Juarez Antonio S. Quaresma (<https://loop.frontiersin.org/people/383537/overview>), Instituto Evandro Chagas, Brazil

Reviewed by:

Sandra M. Muxel (<https://loop.frontiersin.org/people/25201/overview>), Universidade de São Paulo, Brazil

Claudia I. Brodskyn (<https://loop.frontiersin.org/people/30513/overview>), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Brazil

Sunil K. Arora (<https://loop.frontiersin.org/people/30626/overview>), Post Graduate Institute of Medical Education and Research, India

## APÊNDICE 1

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto: **QUANTIFICAÇÃO DO kDNA DE *Leishmania Viannia* POR qPCR EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LESÕES CUTÂNEAS**, que será realizado num período estimado de dois anos no Hospital Universitário de Brasília - HUB. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é doença infecciosa que tem tratamento acessível no território brasileiro.

O principal objetivo do presente estudo consiste em observar a quantidade de protozoários causadores da doença nas diferentes camadas da pele, com a finalidade de desenvolver uma técnica de biópsia mais adequada (profundidade necessária) para o diagnóstico da LTA. Essas amostras serão coletadas através de uma biópsia incisional de 0,5 x 0,5cm, já coletada como rotina para análise neste centro, para detecção do DNA da *Leishmania*. Apenas realizaremos a divisão das camadas da pele antes desta análise. Os possíveis benefícios do projeto são relacionados à apresentação do melhor local para se realizar uma coleta mais adequada e tornar o diagnóstico de LTA mais preciso e eficaz.

A biópsia é um procedimento simples realizado com anestesia local e com duração de alguns minutos, em que um pequeno fragmento da pele é retirado para análise patológica, não resultando em riscos gerais à saúde do Sr. (ª). No entanto, solicitamos ainda a autorização para utilização de todas as informações contidas no prontuário para avaliação em nosso estudo. Em nenhum momento será realizada biópsia apenas para participação neste estudo. Durante a biópsia incisional de pele, pode ocorrer pequeno sangramento, além de dor local. Garantimos que o participante da pesquisa receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Esclarecemos que a participação neste estudo é VOLUNTÁRIA e que este consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízos à continuidade do atendimento médico. Garantimos a confidencialidade das informações geradas e a privacidade do sujeito na pesquisa. Não será revelado o nome de qualquer participante. Eventuais dúvidas poderão ser sanadas, a qualquer momento no telefone (61) 2028-5415 (serviço de Dermatologia) através de contato direto com a equipe de pesquisa. Ao fim da pesquisa, os resultados serão disponibilizados no documento da tese de mestrado da pesquisadora responsável.

Os pesquisadores apresentarão o termo em consulta previamente agendada ou ao encontro do paciente, não sendo previstos gastos com transporte. Garantimos ainda o cumprimento da indenização cabível diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ fui informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ou

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_, responsável legal por \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ fui informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima.

#### **Dados de identificação**

Título do projeto: QUANTIFICAÇÃO DO kDNA DE *Leishmania Viannia* POR qPCR EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LESÕES CUTÂNEAS

Pesquisador responsável: Laís Sevilha dos Santos

Instituição a que pertence o pesquisador responsável: Universidade de Brasília- UnB

Telefones para contato: (61) 2028-5415

Endereço: SGAN avenida L2 norte, quadra 605.

**Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - CEP/FM-UnB**

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina

Faculdade de Medicina.

Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília - DF - Brasil.

CEP: 70.910-900 Telefone: (61) 3107-1918

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Laís Sevilha dos Santos

RG: 3086405-DF

Telefone: 2028-5000

**E-mail:** [cepfm@unb.br](mailto:cepfm@unb.br) **Telefone:** (61) 3107-1918/ **Endereço:** Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília-UnB - Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte Brasília-DF Brasil (CEP: 70.910-900).

## APÊNDICE 2

Nº	Gênero	Idade (anos)	Grupo	Provável contágio	Leishmaniose anteriormente?	Número de lesões	Local das lesões	Evolução (meses) início	Aspecto
3	F	90	Controle		N	1	MMI	2	Úlcera
6	F	30	Controle		N	1	MMS	18	Úlcera
7	F	44	Controle		N	2	MMS	4	Úlcera
8	F	57	Controle	João Pinheiro - MG	N	1	MMI	1.5	Úlcera
9	M	58	Controle		N	1	MMI		Úlcera
10	M	41	Controle		N	2	MMS	1	Úlcera
14	F	29	Controle		S	1	MMI	18	Úlcera
15	M	23	Controle	Terra Ronca - GO	N	1	MMS	24	Úlcera
23	F	28	Controle	Monte Alegre de Goiás - GO	N	3	Tronco	2	Úlcera
24	M	64	Controle		N	1	Tronco	60	Placa
29	M	18	Controle	Vila Planalto - DF	N	12	MMI	1	Úlcera
42	M	44	Controle		S	1	MMS		Pápula
45	F	34	Controle	Jardim Mangueiral - DF	N	2	MMI	5	Úlcera
48	M	48	Controle	Taguatinga - DF	N	1	MMI	3	Úlcera
50	F	66	Controle	Samambaia Norte - DF	N	1	MMI	12	Úlcera
53	M	35	Controle	Taguatinga Norte - DF	N	1	MMI	1.5	Úlcera
54	M	36	Controle	Inkra - DF	N	1	MMI	1	Úlcera
57	F	66	Controle	Coelho Neto - MA	N	1	MMI	1	Úlcera
58	M	34	Controle	Núcleo Rural do Rio Preto - DF	N	2	MMS	3	Úlcera

**Legenda:** F: Feminino / M: Masculino / N: Não / S: Sim / MMI: Membro inferior / MMS: Membro superior.



### APÊNDICE 3

Nº	Gênero	Idade (anos)	Grupo	Provável contágio	Leishmaniose anteriormente?	Número de lesões	Local das lesões	Evolução (meses) início	Aspecto
4	M	29	LTA	Pará - PA	N	1	Tronco	4	Úlcera
5	M	39	LTA	Januária - MG	N	1	Cabeça	2	Úlcera
11	M	68	LTA		N				
12	M	68	LTA		N				
13	M	56	LTA	Ituberá - BA	N	2	MMI	2	Úlcera
16	M	37	LTA	Araguari - MG	N	67	Tronco	5	Úlcera
19	F	65	LTA	Santa Maria da Vitória - BA	N	1	MMI	3	Placa
20	M	66	LTA	Barra do Garça - MT	N	3	MMI	2	Úlcera
21	M	47	LTA	Macuco - MG	N	1	MMI	2	Úlcera
22	M	66	LTA	Caxias - MA	N	1	MMI	4	Úlcera
26	M	57	LTA	Niquelândia - GO	S	3	Tronco		Placa
36	F	32	LTA	Gandu - BA	N	2	MMS	2	Úlcera
37	M	34	LTA	Acre - AC	N	1	MMS		Úlcera
38	M	30	LTA	Acre - AC	N	1	MMS	2	Placa
43	M	37	LTA	Novo Gama - GO	N	1	MMS	4	Úlcera
44	M	66	LTA	Samambaia Vicente Pires - DF	N	2	MMI		Nódulo
47	M	52	LTA	Cidade Ocidental - GO	N	1	Cabeça	24	Úlcera
52	M	56	LTA	Santa Maria da Vitória - BA	N	2	MMS	4	Úlcera
55	F	61	LTA	Minas Gerais - MG	N	2	MMI	2	Úlcera
18	M	65	LTA	Bahia - BA	N	2	MMI	3	Placa

31	M	72	LTA	Paranoá - DF	N	1	MMS	2	Úlcera
33	M	51	LTA		N	3	MMS	4	Placa
34	F	55	LTA		N	1	MMS		Placa
35	F	40	LTA		S	1	MMS	24	Cicatriz
40	M	18	LTA		N	1	MMI	1	Úlcera
46	M	48	LTA	São Raimundo - MA	N	1	MMS	2	Úlcera
51	M	52	LTA	Coribe - BA	N	1	MMI	4	Úlcera
59	F	62	LTA	Luziânia - GO	S	1	MMS	2	Placa
2	F	30	LTA	Planaltina - DF	N	1	MMS	7	Úlcera
17	F	60	LTA		N	5	MMI	0.75	Úlcera
25	F	66	LTA	Cabeceiras de Goiás - GO	N	1	MMI	1	Úlcera
27	F	64	LTA	Setor O - DF	S		Tronco		Placa
28	F	61	LTA		N	2	MMI		Úlcera
30	F	63	LTA		N	1	Cabeça		Úlcera
32	M	65	LTA		N	1	MMI	3	Úlcera
39	M	37	LTA	Cristalina - GO	N	1	MMI		Úlcera
41	M	49	LTA	Pirenópolis - GO	N	1	MMS	2	Placa
49	F	51	LTA	Recanto das Emas - GO	N	1	MMI	1	Úlcera
56	F	21	LTA	Águas Lindas - GO	N	1	MMI	1	Úlcera
60	M	45	LTA	Unaí - MG	N	1	MMS	24	Placa

**Legenda:** F: Feminino / M: Masculino / LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana / N: Não / S: Sim / MMI: Membro inferior / MMS: Membro superior.

## APÊNDICE 4

Nº	Esfregaço	Cultura	IFI	Histopatológico amastigota	Histopatológico compatibilidade	PCR - ITS1	qPCR - epiderme	qPCR - derme superior	qPCR - derme inferior	qPCR - hipoderme	qPCR - paralela
4	P	N	NR	N	S	P	P	P	P	P	P
5	P		R	N	S	P	P	P	P	N	P
11	P	P				P	P	P	P	P	P
12	P	P				P	P	P	P	P	P
13	P	N		N	S	P	P	P	P	P	P
16	N	P	R	N	S	N	P	P	N	N	P
19	N	P	R	S	S	P	P	P	P	P	P
20	P	P	R	N	S	P	P	P	P	P	P
21	N	N	R	N	S	P	P	P	P	P	P
22	N	N	R	N	S	P	P	P	P	P	P
26	N	N	R	N	S	N	P	P	P	P	P
36	P	P	R	N	S	P	P	P	P	P	P
37	P	P	R	N	S	P	P	P	P		P
38	P	P	R			P	P	P	P	P	P
43	N	N	NR	N	S	P	P	P	P	P	P
44	N	N	R			P	P	P	P	P	P
47	N	P	R			N	P	P	P		P
52	N	N	NR	N	S	N	P	P	P	P	P
55	N	N	R	N	S	N	P	P	P	N	P
18	N	P	R	N	S	N	N	P	P	N	P
31	N	N	NR	N	S	N	N	P	N	N	P
33	N	N	NR		S	N	N	P	N	N	P
34	N	N	NR	N	S	N	N	P	N	N	P
35		N	R	N	S	N	N	P	N		P

40	N	N	R	N	N	N	N	P	P	N	P
46	N	N	NR	N	S	N	N	P	P	P	P
51	N	N	R	N	S	N	N	P	P	P	P
59	N	N	R			N	P	N	P	P	P
2	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
17	N	P		N	N	N	N	N	N	N	N
25	N	N	R	N	S	N	N	N	N	N	N
27	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
28	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
30	N	N	NR	N	S	N	N	N	P	N	P
32	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
39	N	N	R	N	S	N	N	N	N	N	N
41	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
49	N	N	R	N	S	N	N	N	N	N	N
56	N	N	NR	S	S	N	N	N	N	N	N
60	N	N		N	S	N	N	N	P	N	P

**Legenda:** N: Negativo / P: Positivo / R: Reagente / NR: Não Reagente/ N: Não / S: Sim.

## APÊNDICE 5

Nº	Esfregaço	Cultura	IFI	Histopatológico amastigota	Histopatológico compatibilidade	PCR - ITS1	qPCR - epiderme	qPCR - derme superior	qPCR - derme inferior	qPCR - hipoderme	qPCR - paralela
3	N	N	NR	N	N	N	N	N	N	N	N
6	N	N	R	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	R	N	N	N	N	N	N	N	N
8	N	N	R	N	N	N	N	N	N	N	N
9	N	N	NR	N	N	N	N	N	N	N	N
10	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
14	N	N	NR	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	R	N	S	N	N	N	N	N	N
23	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N
24	N	N	NR	N	N	N	N	N	N	N	N
29	N	N	R	N	S	N	N	N	N		N
42	N	N	NR	N	N	N	N	N	P	N	P
45	N		R			N	N	N	N	N	N
48	N	N	R	N	S	N	N	N	N	N	N
50	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N
53	N	N	R	N	N	N	N	N	N	N	N
54	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
57	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N
58	N	N	NR	N	S	N	N	N	N	N	N

**Legenda:** N: Negativo / P: Positivo / R: Reagente / NR: Não Reagente/ N: Não / S: Sim.